

Universität Rostock



Traditio et Innovatio

Aus dem Albrecht-Kossel-Institut für Neuroregeneration

Direktor: Prof. Dr. med. A. Rolfs

„Die Wirkung von Trichostatin A in einem zellkultur-basierten Krankheitsmodell des
Morbus Niemann-Pick Typ C“

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Christian Zimmermann

aus Rottach-Egern

Berlin, den 13.4.2018



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

Gutachter:

Prof. Dr. med. Arndt Rolfs, Universität Rostock, Albrecht-Kossel-Institut für
Neuroregeneration

PD Dr. Kirsten Peters, Universität Rostock, Arbeitsbereich Zellbiologie

Prof. Dr. med. Christine Klein, Universität zu Lübeck, Institut für Neurogenetik

Jahr der Einreichung: 2018

Jahr der Verteidigung: 2019

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Berlin, den 13.4.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	iii
1. Einleitung	1
1.1 Morbus Niemann-Pick Typ C: klinische und zelluläre Ebenen	1
1.1.1 Nosologische Ausformung der Erkrankung.....	1
1.1.2 Klinische Ebene	2
1.1.3 Zelluläre Ebene.....	4
1.1.3.1 Funktion und Dysfunktion der NPC-Proteine; Lipidakkumulation	4
1.1.3.2 Struktur der Proteine NPC1 und NPC2	6
1.1.3.3 Proteinfaltungsdefekt.....	7
1.2 Forschungsansätze zur Modellierung von NP-C	10
1.2.1 Chemische Ansätze	10
1.2.2 Tiermodelle	10
1.2.3 Humane Modelle.....	12
1.3 Therapieansätze bei NP-C.....	14
1.3.1 Bisherige Therapieansätze	14
1.3.2 HDACi bei NP-C	15
2 Fragestellung	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Materialien.....	20
3.1.1 Technische Anlagen und Maschinen	20
3.1.2 Software.....	21
3.1.3 Verbrauchsgüter	21
3.1.4 Chemikalien, Puffer.....	22
3.1.5 Zellkulturmedien, -puffer, -supplemente sowie Zusätze.....	23
3.1.6 Antikörper	24
3.1.7 Reaktionskits.....	24

3.2 Methoden.....	25
3.2.1 Zellkultur	25
3.2.1.1 Kultivierung humaner Fibroblastenlinien	25
3.2.1.2 Kultivierung von ReNCell VM-Zellen	26
3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....	27
3.2.1.4 Plasmidkonstrukt; Transfektion der Zellen	27
3.2.2 Proteinanalyse	28
3.2.2.1 Herstellung der Gesamtzelllysate.....	28
3.2.2.2 Proteinmessung	29
3.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
3.2.2.4 Western Blot.....	29
4 Ergebnisse	31
4.1 TSA-Effekt auf Fibroblasten.....	31
4.2 NPC1-Herunterregulation bei hNPZ.....	34
4.3 TSA-Effekt auf hNPZ nach NPC1-Herunterregulation.....	40
5 Diskussion	44
5.1 Etablierung eines zentralnervösen humanen NP-C Modells	44
5.2 NPC1-Induktion durch HDACi bei NPC1 ^{mt} -Fibroblasten	47
5.3 TSA-Wirkung bei hNPZ nach shRNA-Transfektion	49
6 Zusammenfassung.....	51
7 Thesen.....	52
8 Endnoten, Literaturverzeichnis	53
9 Anhang.....	70

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
B27	Zellmedium
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> (basaler Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	<i>cyclic adenosine mono phosphate</i> (zyklisches Adenosinmonophosphat)
CLS	cysteinreiche luminale Schleife
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (nach Dulbecco modifiziertes Eagle-Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
engl.	Englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Degradation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und weitere)
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fetales Kälberserum)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> (Fibroblasen-Wachstumsfaktor)
g	Gramm bzw. Lastvielfaches (Zentrifuge)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gcase	Glukozerebrosidase
GF	<i>growth-factor</i> (Wachstumsfaktor)
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
GM(2/3)	Ganglioside (2/3)
h	Stunde(n)

HAT	Histonacetylase
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i> (Salzlösung, balanciert nach Hanks)
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
hNPZ	humane neuronale Progenitorzellen
HPBCD	2-Hydroxypropyl- β - Cyclodextrin
<i>hsp</i>	<i>heat shock protein</i> (Hitzeschockprotein)
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (das bedeutet)
IPS	induzierte pluripotente Stammzellen
JPG11	NPC1-Herunterregulationskonstrukt „JPG11“
JPG15	NPC1-Herunterregulationskonstrukt „JPG15“
k	Kilo
Kont	Kontrolle
l	Liter
LDL	<i>low density lipoprotein</i> (Lipoprotein niedriger Dichte)
LE/L	<i>late endosome/lysosome</i> (spät-endosomal/lysosomal)
LM	Lichtmikroskop
M	Molar
m	Milli
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
mt	Mutation; mutiert
n	Nano
NP-A	Morbus Niemann-Pick Typ A
NP-B	Morbus Niemann-Pick Typ B
NP-C	Morbus Niemann-Pick Typ C1
NPC1	Niemann-Pick Typ C1-Gen
NPC1 ^{I1061T}	NPC1 ^{I1061T}
NPC1 ^{kd}	NPC1- <i>knockdown</i> (NPC1-Herunterregulation)
NPC1 ^{mt}	NPC1-Mutation
NPC1 ^{wt}	NPC1-Wildtyp
NPC2	Niemann-Pick Typ C2-Gen
NP-D	Morbus Niemann-Pick Typ D (veraltet)
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

Abkürzungsverzeichnis

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pG-SHIN2/PGSHIN	Leervektor (als Kontrolle)
RFU	<i>raw field units</i> (in etwa: grobe Feldeinheiten)
RIPA-Puffer	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i> (Radioimmunopräzipitations-Untersuchungs-Puffer)
RNA/RNS	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen per Minute)
s.	siehe
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
SRT	<i>substrate reduction therapy</i> (Substratreduktionstherapie)
SSD	<i>sterol sensing domain</i> (Sterolbindungsstelle)
t	Zeit
TSA	Trichostatin A
U18666A	3-β-[2-(Diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-on
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
VSBP	vertikale supranukleäre Blickparese
<i>well</i>	Kavität
wt	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Morbus Niemann-Pick Typ C: klinische und zelluläre Ebenen

1.1.1 Nosologische Ausformung der Erkrankung

Die Bezeichnung “Morbus Niemann-Pick” wurde in den 1920er Jahren durch Albert Niemann und Ludwig Pick für eine heterogene Gruppe genetisch bedingter neurologischer Erkrankungen geprägt (Vanier, 2010). Diese zeichneten sich durch Hepatosplenomegalie sowie Sphingomyelin-Speicherung in retikuloendothelialen und parenchymatösen Organen bei meist in der Folge auftretender neurologischer Beteiligung aus. Weitere nosologische Ausdifferenzierung erfolgte in den 1950ern durch Crocker und Farber (Crocker und Farber, 1958), die eine klinisch orientierte Unterteilung in vier Untergruppen nach Akuität, Manifestationsort der Symptomatik und Betroffenheitsgrad vorschlugen: Typ A wurde als schwere zentralnervöse, akute Form mit massiver neuroviszeraler Sphingomyelinspeicherung charakterisiert, Typ B unterschied sich durch den chronischen Verlauf bei Absenz neurologischer Affektion. Typen C und D zeichneten sich durch einen subakuten Verlauf mit vornehmlich neurologischen und milderen neuroviszeralen Symptomen aus. Brady *et al.* konnten 1966 eine biochemische Neudefinition der durch Crocker und Farber klinisch-anamnestisch unterschiedenen Entitäten vornehmen: sie führten den Nachweis, dass bei den bisherigen Typen A und B, aber nicht bei C und D, die Enzymaktivität der sauren Sphingomyelinase defizient war (Brady *et al.*, 1966). In Folge der Beschreibung eines Mausmodells mit Charakteristika einer genetisch bedingten Speicherkrankheit (Pentchev *et al.*, 1980, 1984) gelang die Aufdeckung der Erkrankung Niemann-Pick Typ C (NP-C) als Cholesterolspeichererkrankung; Typ D (NP-D) wurde als Bezeichnung für eine Patientenpopulation von Akadiern in Neuschottland geführt.

Im Jahr 1997 konnten Mutationen im Gen NPC1 als genetische Ursache des Typ C aufgedeckt werden (Carstea *et al.*, 1997). Fälle von Typ D konnten ebenfalls auf eine Punktmutation im NPC1-Gen zurückgeführt werden, die komplettes genetisches Kopplungsungleichgewicht für Fälle von NP-D aufweist (Greer *et al.*, 1998). Der Typ NP-D wurde somit als allelische Variante des Typs C identifiziert und als Unterkategorie aufgegeben (Vanier, 2010). Das Gen NPC1 wurde auf Chromosom 18q11-q12 lokalisiert; es erstreckt sich über 56 Kilobasen und enthält 25 Exons¹. In 95% der Fälle verursachen Mutationen im Gen NPC1 die Erkrankung; die restlichen

Einleitung

Fälle sind durch Mutationen im Gen NPC2 bedingt, welches wenig später charakterisiert wurde (Naureckiene *et al.*, 2000) und bei Mutationen einen phänotypisch nicht von NPC1-Mutationen unterscheidbaren Erkrankungsphänotyp hervorbringt. Im Folgenden wird die Abkürzung „NP-C“ für die durch Mutationen im Gen NPC1 verursachte Erkrankung verwendet.

1.1.2 Klinische Ebene

NP-C ist eine seltene Erkrankung. Epidemiologische Studien gehen von einer Inzidenz von 1/120.000 – 150.000 Geburten aus, wobei die Inzidenz aufgrund der Variabilität klinischer Ausprägungen und des geringen klinischen Bekanntheitsgrades wahrscheinlich unterschätzt wird (Vanier, 2010). Die Erkrankung bereitet nicht zuletzt durch große Heterogenität der Ausprägungen Schwierigkeiten in der klinischen Diagnose (Hendriksz *et al.*, 2017). Das Altersspektrum der Betroffenen reicht von wenigen Tagen alten Neugeborenen bis zu über Siebzيجjährigen, von subklinischen Veränderungen wie diskreter Splenomegalie bis zu schweren Verläufen, die bereits prä- oder perinatal tödlich verlaufen. Das Durchschnittsalter bei Diagnose liegt nach einem Fragebogen der US-amerikanischen *National Niemann-Pick C1 Disease Database* bei 10,4 Jahren, das Durchschnittsalter bei Eintritt des Todes bei 16,2 Jahren (Garver *et al.*, 2007). Die in sich sehr verschiedenen Verläufe in verschiedenen Altersgruppen schränken die Bedeutung der genannten Durchschnittsdaten für den Einzelfall ein. Deswegen ist eine Einteilung nach Zeitpunkt der Erstmanifestation üblich. Der dazu folgende Abschnitt zu Symptomatik und Diagnostik orientiert sich an Arbeiten von Marie-Thérèse Vanier (Vanier, 2010; Vanier und Millat, 2003) und der *NP-C Guidelines Working Group* (NP-C Guidelines Working Group *et al.*, 2009), wobei zuerst die allgemeine Symptomatologie dargestellt werden soll.

NP-C ist eine neuroviszerale Erkrankung, die zu Neurodegeneration führt. Die viszerale Komponente von NP-C setzt sich aus isoliert oder kombiniert auftretender Hepato-/Splenomegalie, neonatalem Ikterus sowie – seltener – pulmonaler Beteiligung zusammen. Sie geht immer, wenn auch teils nur diskret ausgeprägt, der systemischen Ausprägung der Erkrankung voraus. Neurologische Erscheinungsformen sind Ausdruck fortschreitender Neurodegeneration und beinhalten zerebelläre Ataxie, Dysarthrie, Dysphagie, voranschreitende Demenz und vertikale supranukleäre Blickparese (VSBP). Die eher spät im Krankheitsverlauf einsetzenden Schluckstörungen machen häufig eine Gastrostomie nötig. Kataplexie, Krampfanfälle und Dystonien kommen gehäuft vor; psychiatrische Manifestationen, insbesondere

therapierefraktäre Verläufe mit gehäuften Nebenwirkungen auf Neuroleptika, sind bei Patienten mit späterem Manifestationsalter häufig. Hinsichtlich der Prognose der Erkrankung sind die neurologischen, nicht die viszeralen, Symptome und deren Beginn entscheidend. Aspirationspneumonien bei zunehmender Dysphagie gelten generell als häufigste Todesursache (Walterfang *et al.*, 2012). Das bei einer Untergruppe von Patienten mit perinataler Präsentation zum Tode führende fulminante Leberversagen stellt eine Besonderheit dieser Altersgruppe dar (Spiegel *et al.*, 2009; Vanier, 2010).

Perinatale sowie Manifestationen im frühen Kleinkindalter äußern sich in länger anhaltendem neonatalen Ikterus beziehungsweise verzögerter motorischer und kognitiver Entwicklung. Betroffene Kinder erreichen selten das sechste Lebensjahr. Im späten Kleinkindalter (3. - 6. Lebensjahr) stehen zunächst viszerale Befunde im Vordergrund, die in vielen Fällen in neurologische Symptome und Entwicklungsverzögerungen übergehen. Der Tod tritt bei diesen frühen Manifestationsformen meist zwischen dem achten und 13. Lebensjahr ein. Die juvenile Manifestationsform im Alter von sechs bis 15 Jahren gilt als die klassische Form. Sie zeichnet sich durch das Auftreten von neurologischen Symptomen nach vorhergehender Hepatosplenomegalie aus; Aufmerksamkeitsstörungen, Schwierigkeiten mit der Handschrift und typisch neurologische Symptomatiken wie VSBP und gelastische Kataplexie mit oder ohne begleitende Narkolepsie treten auf. Meist steht der motorische gegenüber dem intellektuellen Verfall im Vordergrund, das Auftreten psychotischer Episoden ist nicht selten. Ein Fortschreiten der Erkrankung ist an zunehmender Dysarthrie und daraus resultierendem Mutismus, Pyramidenbahnzeichen und Schluckproblemen zu erkennen. Bei gewisser Variabilität beträgt die Lebenserwartung bei diesem klassischen juvenilen Typ bis 30 Jahre. Als prädiktiv für eine schlechte Prognose gelten Krankheitsmanifestation im späten Kleinkindalter und Auftreten schwerer Epilepsien. Die Entwicklung der Erkrankung im Adoleszenten- oder Erwachsenenalter wird wahrscheinlich häufig übersehen und gleicht der klassischen juvenilen Manifestationsform, allerdings mit subtilerem Auftreten. Psychiatrische Symptomatiken treten in dieser Altersgruppe häufiger auf (für einen Fallbericht s. Campo *et al.*, 1998), während die neurologischen Symptome und der terminale Verlauf der Erkrankung den anderen Altersgruppen gleichen.

NP-C ist eine genetisch bedingte Erkrankung, die einem autosomal-rezessiven Erbgang folgt. Den diagnostischen Goldstandard stellt eine Genanalyse sowie die

Kultur und Filipin-Färbung von Fibroblasten aus Hautbiopsaten dar. Aufgrund der hohen Rate von NPC1-Polymorphismen gilt die Genanalyse als schwierig. Daher sollte die Genanalyse primär bei Verwandten bekannte Mutationen und Genloci mit hoher Prävalenz im Herkunftsland des Patienten berücksichtigen. Die Kultur von Patienten-Fibroblasten findet im LDL (*low density lipoproteins*) -angereicherten Medium statt, auf welche sich Fixierung und Filipintest anschließen (Vanier und Latour, 2015). Das Polyen-Antibiotikum Filipin bindet spezifisch an nicht-verestertes Cholesterol, welches sich im Falle von NP-C in einem perinukleär-vesikulären Muster anreichert (Kruth *et al.*, 1986; Sokol *et al.*, 1988; Vanier, 2010). Bei hochpositiven Ergebnissen, die bei 80-85% der Patienten auftreten und Indikator für starke Lipidakkumulation sind, gilt die Diagnose NP-C als gesichert. Als alternatives Färbungsverfahren zur Detektion lysosomaler Speicherung in kultivierten Fibroblasten gilt *Lyso-Tracker* (Rodriguez-Gil *et al.*, 2013). Dessen Färbungsintensität korreliert mit dem Alter des Patienten bei Auftreten systemischer wie neurologischer Symptome und bietet so eine Möglichkeit zur Einschätzung der wahrscheinlichen Krankheitsprogression.

NP-C gilt als unterdiagnostiziert, da es einerseits für die Erkrankung vielfach an klinischem Bewusstsein fehlt. Andererseits gelingt ein verlässliches *screening* mit heutigen Ansätzen nur mit Einschränkungen. Vorgenannte aufwändige diagnostische Methoden eignen sich hierfür nicht. Der Biomarker Lyso-Sphingomyelin-509 eröffnet in diesem Zusammenhang Perspektiven auf eine hochsensitive und –spezifische Früherkennung von NP-C aus Blutplasma-Proben (Giese *et al.*, 2015). Eine frühe Detektion der Erkrankung ist von essentiellem Wert, da therapeutische Ansätze sich bislang auf Verhinderung weiterer Progression beschränken (vgl. Abschnitt 1.3).

1.1.3 Zelluläre Ebene

1.1.3.1 Funktion und Dysfunktion der NPC-Proteine; Lipidakkumulation

Die nachweisbare Anreicherung von Lipiden bei Mutationen in den Genen NPC1 und NPC2 lässt auf die Bedeutung dieser Gene für den zellulären Lipidstoffwechsel schließen. Obwohl die genaue Funktion der NPC-Proteine nicht gesichert ist, wird derzeit von einer Rolle in der Vermittlung des Cholesterol-Egress und weiterer Lipide wie Oxysterolen aus den späten Endosomen bzw. Lysosomen (*late endosome/lysosome*, LE/L) ausgegangen (Vance *et al.*, 2005). Unter physiologischen Umständen wird zur Cholesterolversorgung der Zellen in peripheren Geweben LDL

aufgenommen, im Zentralnervensystem erfolgt die Versorgung mit Cholesterolen durch endogene Synthese in Oligodendrozyten, da die Blut-Hirn-Schranke nicht LDL-permeabel ist (Vance *et al.*, 2005). Cholesterole werden nach rezeptorvermittelter endozytotischer Aufnahme an LE/L weitergeleitet, um dort hydrolysiert und anschließend zur weiteren zellulären Nutzung verfügbar gemacht zu werden. An diesem Punkt des zellulären Lipidmetabolismus wird die Funktion der NPC-Proteine vermutet, da deren Ausfall prominente Lipidakkumulation bewirkt und einen Weitertransport der Lipide an endoplasmatisches Retikulum und Plasmamembran verhindert. Es akkumulieren beim Menschen im zentralen Nervensystem im Wesentlichen die in der Sphingolipid-Synthese gebildeten komplexen Ganglioside (GM2, GM3; Vanier, 1999), während es in peripheren Organen hauptsächlich zur Akkumulation von unverestertem Cholesterol, Sphingomyelin, Glykosphingolipiden, Sphingosin und lysosomen-spezifischem Phospholipid kommt (Karten *et al.*, 2009; Vanier, 2010). Im *knock-out* Mausmodell *BALB/c-Npc1^{m1N}* konnte zerebrale Akkumulation unveresterter Cholesterole demonstriert und als ein möglicher Auslöser für Neurodegeneration beschrieben werden. Weiterhin konnte die Reduktion unveresterter Cholesterole durch Cyclodextrin-Behandlung die Neurodegeneration vermindern (Aquil *et al.*, 2011; Maass *et al.*, 2014).

Dass Mutationen in beiden Genen einen klinisch nicht unterscheidbaren Krankheitsphänotyp hervorbringen, legt ein Zusammenspiel der beiden Proteine nahe (s. Abbildung 1-1; Sleat *et al.*, 2004; Vanier, 2014). Derzeit wird die Theorie eines „*hydrophobic handoff*“ favorisiert, die von einer Weitergabe des endozytotisch aufgenommenen Cholesterol von NPC2 zu NPC1 ausgeht (Abi-Mosleh *et al.*, 2009; Vanier, 2014; Wang *et al.*, 2010). Durch Weitergabe von Cholesterol vom solublen NPC2 zum membranständigen NPC1 wird eine Umgehung der hydrophilen Phase ermöglicht, da beide Proteine hydrophobe Strukturen aufweisen. Das NPC1-Protein alleine oder auch im strukturellen Verbund mit NPC2 (Deffieu und Pfeffer, 2011) ermöglicht dann den Durchtritt von Cholesterol durch die LE/L-Membran auf bisher unbekannte Weise.

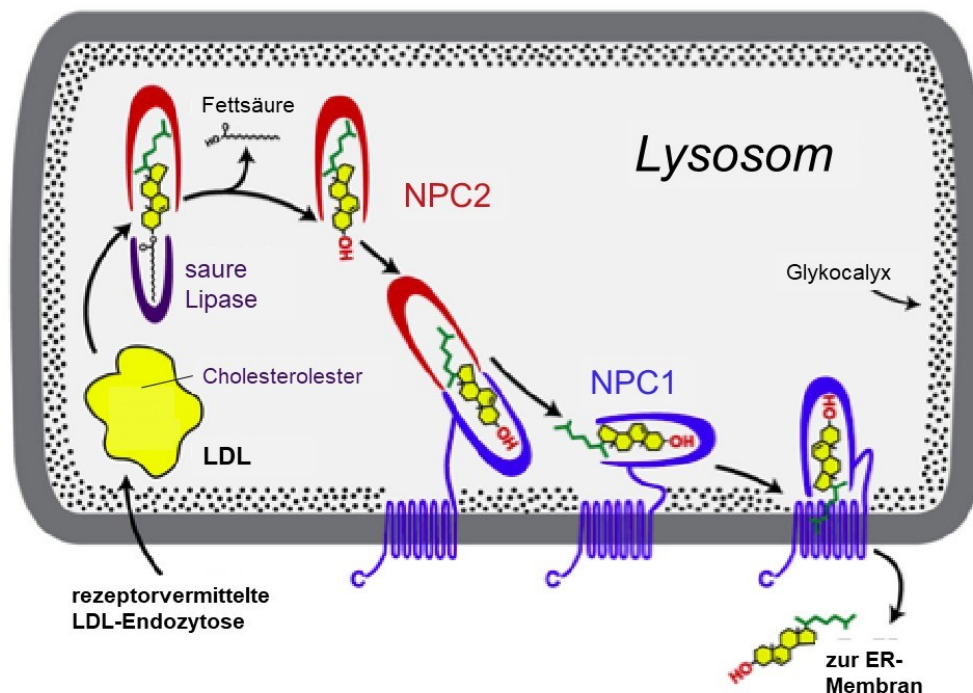


Abbildung 1-1: NPC1 und NPC2 kooperieren in der Vermittlung des Cholesterol-Egrees aus Lysosomen

Vereinfachte modellhafte Darstellung eines Lysosoms. Nach rezeptorvermittelter LDL-Endozytose werden Fettsäuren von Cholesterolestern durch das Enzym saure Lipase abgespalten. Die verbleibenden unveresterten Cholesterole werden von NPC2 aufgenommen und an NPC1 weitergereicht, das als membranständiges Protein den Durchtritt der unveresterten Cholesterole durch die Lysosomenmembran vermittelt. Adaptiert nach Kwon *et al.*, 2009

1.1.3.2 Struktur der Proteine NPC1 und NPC2

Das NPC1-Protein² (Abbildung 1-2) ist ein großes Membranprotein mit spätendosomal/lysosomaler Lokalisation und einer Länge von 1278 Aminosäuren. Es weist 13 Transmembrandomänen auf, von welchen insbesondere die *sterol-sensing-domain* (SSD) und die cysteinreiche luminaire Schleife (CLS) von Bedeutung sind. Die SSD dient der Erkennung und Bindung von Cholesterol (Kwon *et al.*, 2009), der genaue Mechanismus ist jedoch nicht bekannt. Wenn Mutationen den Aufbau der SSD betreffen, resultiert der schwerwiegende juvenil-neurologische Krankheitsverlauf (Millat *et al.*, 2001). Der CLS wird hingegen eine Rolle in der Protein-Protein-Interaktion zugeschrieben; Mutationen in dieser sind für die Manifestation variabler klinischer Phänotypen von unterschiedlichem Schweregrad verantwortlich (Millat *et al.*, 2001). In dieser Struktur befinden sich circa ein Drittel aller bekannten NPC1-Mutationen und die häufigste einzelne NPC1-Mutation in Mittel- und Nordeuropa, NPC1^{I1061T}. Die Art der Mutationen korreliert teilweise mit der Schwere der Erkrankung (eingeschränkte

Genotyp-Phänotyp-Korrelation): heterozygote NPC1^{I1061T}-Mutationen bedingen – in Abhängigkeit vom zweiten Allel – eher mildere Krankheitsphänotypen; im Vergleich dazu sind homozygote Ausprägungen für die klassische juvenil-neurologische Manifestationen der Erkrankung verantwortlich (Millat *et al.*, 1999, 2001). Für NPC1^{I1061T} konnte der Beweis erbracht werden, dass ein grundsätzlich funktionelles, aber fehlgefaltetes NPC1-Protein gebildet wird (Gelsthorpe *et al.*, 2008; Praggastis *et al.*, 2015). Mehr als die Hälfte der 387 bekannten Mutationen im NPC1-Gen sind, wie die Mutation NPC1^{I1061T} auch, *missense*-Mutationen (*human gene mutation database* (HGMD³) und stellen damit einen bedeutsamen Teil der NPC1-Mutationen dar.

GM03123: 1: P237S, 2: I1061T

GM18436: 1: E612D, 2: F542fsX

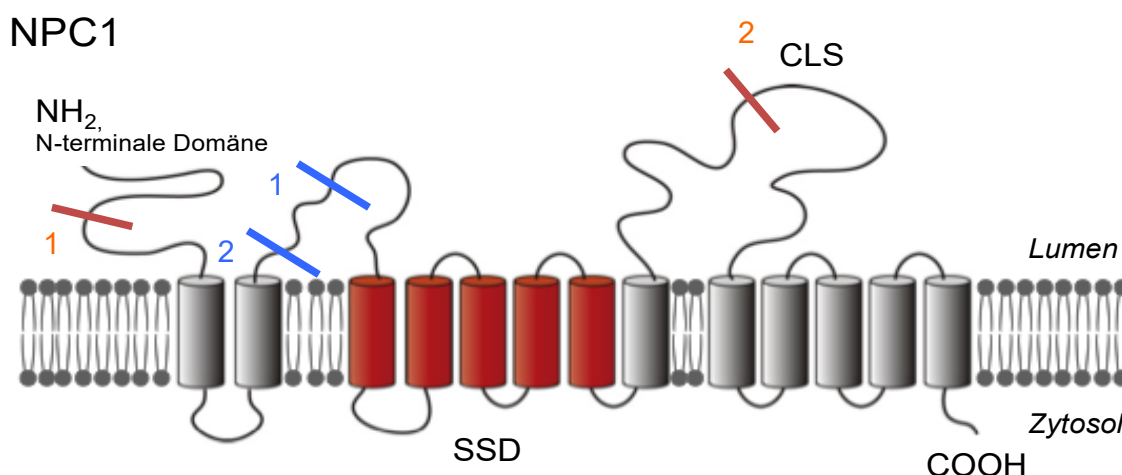


Abbildung 1-2: Struktur des NPC1-Proteins

CLS = cysteinreiche luminal Schleife, SSD = *sterol-sensing-domain*. Adaptiert nach Cianciola *et al.*, 2011, Position der Mutationen in den in dieser Arbeit verwendeten NPC1^{mt}-Fibroblasten GM03123 (rote Balken) und GM18436 (blaue Balken) nach Davies und Ioannou, 2000.

1.1.3.3 Proteinfaltungsdefekt

Proteine müssen zur Ausführung ihrer Funktionen und der Vermeidung toxischer Wirkung ihre korrekte Konformation durch Faltung erlangen. Die Information für korrekte Faltung des Proteins ist in seiner Primärstruktur, *i. e.* in seiner Aminosäuresequenz, enthalten. Sie ist damit auch von der Integrität der genetischen Sequenz abhängig. Weiterhin sind Chaperone (unter anderem in Form von *heat shock proteins*, Hsp), die die Aggregation noch nicht oder falsch gefalteter Proteine

verhindern, von Bedeutung. Im un- beziehungsweise fehlgefalteten Zustand von Proteinen liegen hydrophobe Sequenzen frei, die zur Aggregatbildung prädisponieren (Daggett und Egelman, 2012; Löffler, 2008). Wird keine korrekte Proteinkonformation erreicht, können toxische Wirkung durch Aggregation und Funktionsdefizit des alterierten Proteins und dessen Abbau über die Endoplasmatisches Retikulum-assoziierte Degradation (ERAD) und den nachgeschalteten Ubiquitin-Proteasom-Pfad die Folge sein. Fehlgefaltete Proteine können dennoch Restaktivität zeigen, sodass Überexpression ein Funktionsdefizit mindern kann (Spear und Ng, 2003). Proteinfaltungsdefekte gelten als zentrales pathophysiologisches Moment für eine Reihe von Erkrankungen; von diesen nehmen einige einen neurodegenerativen Verlauf. Hierzu gehören häufige Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Chhangani und Mishra, 2013) wie auch seltene Erkrankungen wie Morbus Gaucher (Yang *et al.*, 2013). Letztere weist als lysosomale Speicherkrankheit zudem enge pathophysiologische Verwandtschaft zu NP-C auf.

Aufgrund der Abhängigkeit der Protein-Sekundärstruktur von der Aminosäuresequenz und damit von der Integrität der Gensequenz können Genmutationen zu Konformationsstörungen der korrespondierenden Proteine führen. Im Falle von Morbus Gaucher konnte ein Proteinfaltungsdefekt infolge von *missense*-Mutationen nachgewiesen werden, der die Aktivität der Glukocerebrosidase bei grundsätzlich erhaltener Funktionalität des Proteins vermindert und dessen Degradation bewirkt (Adnan *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2013, 2014, 2015). Wie bei Morbus Gaucher liegen bei NP-C meist *missense*-Mutationen vor, die mit einem Funktionsdefizit des zu kodierenden Proteins einhergehen. Experimentelle Befunde zur NPC1-Mutation NPC1^{I1061T} stützen die Hypothese, dass dieses Defizit auf einen Faltungsdefekt zurückzuführen ist: So führen Mutationen im Protein NPC1 zu verminderter zellulärer NPC1-Verfügbarkeit im Western Blot. Ebenfalls im Western Blot nachweisbar ist ein verändertes NPC1-Bandenmuster, was auf qualitative Veränderungen des NPC1^{I1061T}-Proteins schließen lässt (Watari *et al.*, 2000). Das NPC1^{I1061T}-Protein unterliegt zum einen deutlich gesteigerten Degradationskinetiken gegenüber dem NPC1^{wt}-Protein (Gelsthorpe *et al.*, 2008; Praggastis *et al.*, 2015), sodass verminderte Stabilität und vermehrte Degradation des Proteins angenommen werden müssen (vgl. Abbildung 1-3). Zum anderen scheitert die Maturierung des Proteins infolge der Mutation an seiner Sequestrierung im endoplasmatischen Retikulum, sodass es nicht seine physiologische Lokalisation im Lysosom einnehmen

kann. Die Inhibition proteasomaler Degradation sowie die Förderung der Maturation des Proteins durch Behandlung mit Chaperonen kann eine Restauration des NPC1-Gehalts in der Zelle bewirken (Gelsthorpe *et al.*, 2008; Macías-Vidal *et al.*, 2014; Praggastis *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2012). Die Wirksamkeit von Chaperonen und Degradation über den ERAD-Pfad sind klare Hinweise auf das Vorhandensein eines Faltungsdefekts, welcher sich auch bei anderen NPC1-Mutationen findet (Zampieri *et al.*, 2011).

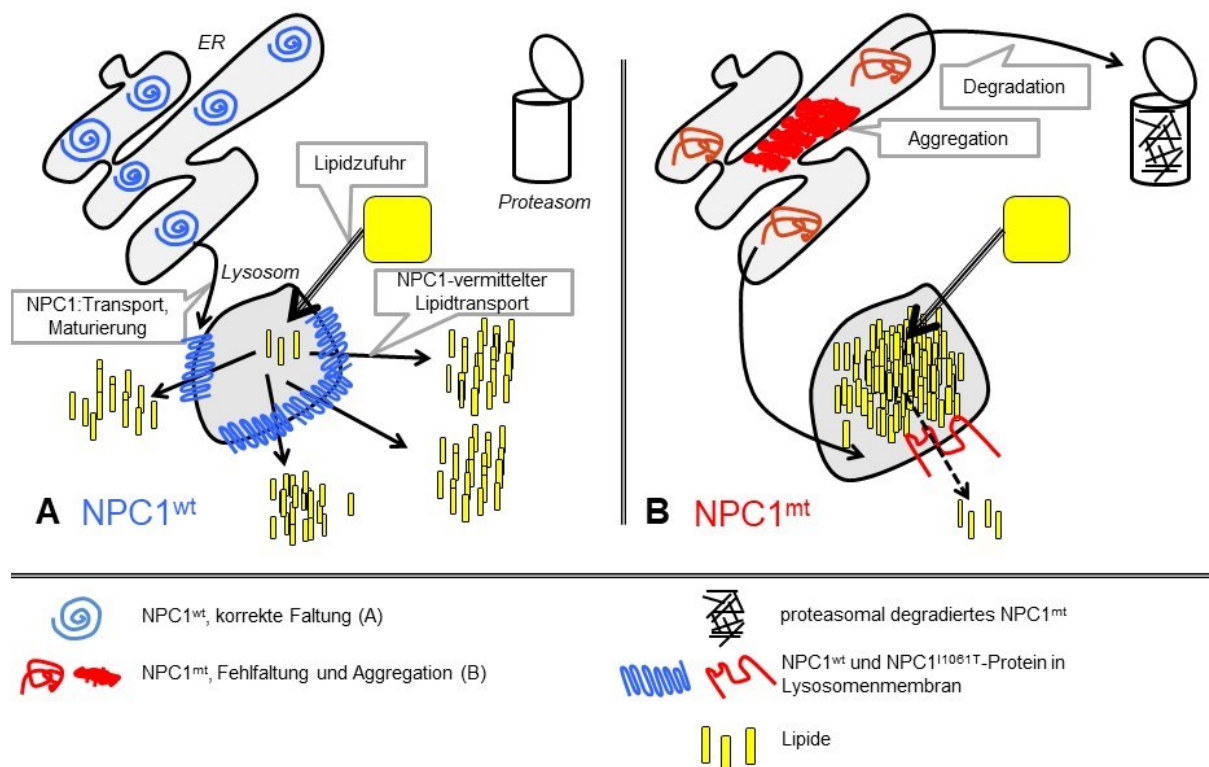


Abbildung 1-3: Mutationen im NPC1-Gen können Proteinfaltungsdefekte verursachen

Modellhafte vereinfachte Darstellung des intrazellulären Raums mit Fokus auf NPC1-vermittelten zellulären Lipidtransport. **A, Wildtyp (NPC1^{wt}):** Nach Synthesisierung im endoplasmatischen Retikulum (ER) entwickelt NPC1^{wt} die korrekte Konformation, nimmt seine Position in der Lysosomenmembran ein und wirkt dort als Lipidtransporter. **B, Mutation (NPC1^{mt}):** NPC1^{mt}-Protein weist nach Synthesisierung einen Faltungsdefekt auf, neigt zur Aggregation und wird proteasomal degradiert. Nur ein geringer Teil des synthetisierten NPC1^{mt}-Protein kann seine korrekte Lokalisation einnehmen und am Lipidtransport teilnehmen.

NPC1^{wt} = NPC1-Wildtyp; NPC1^{mt} = NPC1-Mutante; ER = endoplasmatisches Retikulum

1.2 Forschungsansätze zur Modellierung von NP-C

1.2.1 Chemische Ansätze

Zelluläre Modelle haben in der Erforschung von NP-C eine bedeutsame Rolle. Zur chemischen Induktion eines NP-C Phänotyps wurden Pharmaka aus der Gruppe der Klasse 2-Amphiphilen verschiedentlich genutzt (Koh und Cheung, 2006; Lange *et al.*, 2000; Liscum und Faust, 1989). Zu diesen gehören Progesteron (Butler *et al.*, 1992), Imipramin (Rodriguez-Lafrasse *et al.*, 1990) und U18666A (3-β-[2-(Diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-on; Liscum und Faust, 1989). Sie verursachen eine Zunahme intrazellulären Cholesterols und bewirken ein Lipid-Akkumulationsmuster wie bei NP-C (Koh und Cheung, 2006; Lange *et al.*, 2000). Es wird eine Inhibition verschiedener Enzyme durch diese Stoffe beschrieben, wobei die exakten Mechanismen unklar bleiben (Koh und Cheung, 2006). Eine direkte Interaktion mit NPC1 wurde vermutet (Neufeld *et al.*, 1999), jedoch legt die strukturelle Diversität der Klasse 2-Amphiphilen eine eher allgemeinere Wirkweise nahe (Koh und Cheung, 2006). U18666A gilt als das meistverwendete Pharmakon zur Herstellung eines zellulären NP-C Phänotyps. Nachteile einer chemisch-pharmakologischen Herstellung des NP-C Phänotyps bestehen in der Unklarheit bezüglich des tatsächlichen Wirkmechanismus; bisherige Arbeiten gehen von einer Beeinflussung von Enzymen aus, welche in der natürlichen NP-C Pathophysiologie keine Rolle spielen. Die weiteren Wirkungen von U18666A hinsichtlich der Auslösung von Autophagie und der Vermehrung des oxidativen Stresses in Zellen (Koh und Cheung, 2006) gelten zwar auch als bedeutsam für NP-C, stellen jedoch nicht den primären pathophysiologischen Defekt des Proteins dar. ER-assoziierte Faltungsdefekte sowie Testung von Pharmaka in ihrer Wirkung auf das Protein erlaubt dieses Modell nicht. Durch U18666A kann also allenfalls der Phänotyp nachgestellt werden, den primären Proteindeфект bilden genannte Substanzen jedoch nicht nach.

1.2.2 Tiermodelle

Nicht-murine Modelle konnten in *saccharomyces cerevisiae* (Malathi *et al.*, 2004), *Caenorhabditis elegans* (Sym *et al.*, 2000), *Drosophila* (Huang *et al.*, 2005), sowie in größeren Säugern als kanide (Kuwamura *et al.*, 1993) und feline (Lowenthal *et al.*, 1990) Modelle beschrieben werden. Murine Modelle, die auf Spontanmutationen zurückgingen, blieben in der Erforschung von NP-C jedoch am einflussreichsten. In den Sechzigerjahren wurden Mäuse beschrieben, welche im Alter von drei Monaten

deutlichen Gewichtsverlust und Vergrößerung von Lymphgewebe bei gleichzeitiger Akkumulation von Lipiden aufwiesen; zusammen mit Anzeichen für eine autosomal-rezessive Vererbung wurde hier mutmaßlich eine Mauslinie mit NP-C beschrieben (NPC1^{fm}, Lyon *et al.*, 1965). In den Achtzigerjahren gelang erstmals eine umfängliche Charakterisierung eines NP-C Mausmodells. Die Arbeitsgruppe um Peter Pentchev beschrieb ein Mausmodell, welches aus BALB/c-Mäusen hervorging und NPC1^{nih} genannt wurde. Es trat prominente viszerale und neuronale Lipidakkumulation bei verminderter Aktivität der Sphingomyelinase und Glukocerebrosidase auf. Wie nach der Entdeckung des NPC1-Gens (Carstea *et al.*, 1997) gezeigt werden konnte, führte der hier zugrundeliegende Gendefekt zu einer Rasterschub (*frameshift*)-Mutation und daraus resultierender vollständiger Defizienz (*knock-out*) des NPC1-Gens. Klinisch zeigten die Mäuse bei komplettem Fehlen von NPC1 einen frühen Beginn neurologischer Symptome sowie Gewichtsverlust und verstarben nach zehn bis 14 Wochen. Genannte Veränderungen der Enzymaktivität stellen einen Unterschied zur menschlichen Pathophysiologie dar (Bhuvaneshwaran *et al.*, 1982; Morris *et al.*, 1982; Pentchev *et al.*, 1980, 1984; Shio *et al.*, 1982). Es wurde bald darauf ein weiteres Mausmodell identifiziert (NPC1^{spm}, Miyawaki *et al.*, 1982), welches dem NPC1^{m1n}-Modell in den meisten Aspekten glich.

Vorgenannte Modelle weisen schwere klinische Phänotypen von NP-C auf. Jedoch sind die weitaus meisten menschlichen Krankheitsfälle von NP-C eher langsamer verlaufende Formen aufgrund von *missense*-Mutationen (Park *et al.*, 2003; Runz *et al.*, 2008; Vanier und Millat, 2003). Ein Mausmodell mit einer Punktmutation im NPC1-Gen und einem einzelnen Aminosäuretausch an Position D1005G bildet einen entsprechenden langsameren Verlaufstyp ab (Maue *et al.*, 2012). Es ist die cysteinreiche Schleife im luminalen Teil des NPC1-Proteins betroffen, welche eine beim Menschen häufig auftretende Mutationsklasse abbildet.

Die in Westeuropa häufigste Mutation ist ebenfalls eine *missense*-Mutation und führt zum Aminosäuretausch I1061T. Im Jahr 2015 wurde ein *knock-in* Mausmodell mit genannter Mutation und den typischen NP-C Charakteristika generiert (Praggastis *et al.*, 2015); es erlaubt somit Untersuchungen von Protein-Faltungsdefekten, welche für die humane Pathophysiologie von NP-C von zentraler Bedeutung sind (Gelsthorpe *et al.*, 2008; Vanier, 2010, vgl. Abschnitt 1.1.3.3).

Mausmodelle differieren jedoch in einigen Punkten von der menschlichen NP-C Pathophysiologie. Beispielsweise werden bei NP-C in Mäusen im Gegensatz zum

Menschen keine Neurofibrillen oder ektope Dendriten gebildet (Love *et al.*, 1995; Walkley und Suzuki, 2004). Außerdem findet die neuronale Manifestation bei Mäusen anders als beim Menschen fast ausschließlich im Zerebellum statt (Karten *et al.*, 2009; Love *et al.*, 1995; Vance *et al.*, 2006), wobei die Beteiligung von Sinnesorganen (Hovakimyan *et al.*, 2011, 2013a; Meyer *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2014a) und der Myelinisierung (Yan *et al.*, 2011) ebenfalls beschrieben wurden. Deswegen ist die Generierung eines humanen NP-C Krankheitsmodells von großem Interesse.

1.2.3 Humane Modelle

Im Rahmen der Diagnostik bei menschlichen Krankheitsfällen von NP-C werden Fibroblasten-Biopsien zur Diagnostik herangezogen und erlauben mutationsspezifische Untersuchungen. NP-C als monogenetische Erkrankung ermöglicht die Untersuchung ihrer Pathophysiologie an einzelnen Zellen, da der Gendefekt ubiquitär ausgeprägt wird. Forschung zu NP-C an Patienten-Fibroblasten ermöglichte insbesondere die Charakterisierung des biochemischen Phänotyps peripherer NPC1^{mt}-Zellen beim Menschen. Gewinnung der Zellen von betroffenen Patienten gestattet die direkte Gegenüberstellung von klinischem und korrespondierendem molekularen Phänotyp. In Form der Filipinreaktivität ist somit ein *readout*-System vorhanden, welches eine Unterscheidung in klassische, intermediäre und Varianten-Phänotypen erlaubt (Vanier und Latour, 2015), wobei die diagnostische Prozedur aufwendig ist und nur von wenigen Laboren vorgehalten wird.

Fibroblasten stellen somit ein wertvolles Modellsystem für die Untersuchung der Pathophysiologie peripherer Zellen bei NP-C dar. Insbesondere die Akkumulation unveresterter Cholesterole in Lysosomen sowie deren Auswirkungen auf das endosomal-/lysosomale System wurden in Fibroblasten vielfach dokumentiert (Vanier, 2010) und es konnten anhand dieser Zellen therapeutische Möglichkeiten aufgezeigt werden (z. B. Munkacsı *et al.*, 2011; Pipalia *et al.*, 2011). Die weite Verbreitung Fibroblasten-gestützter Studien zu NP-C wurde nicht zuletzt durch die leichte Gewinnung der Zellen durch Biopsie bei NP-C-Patienten im Rahmen des diagnostischen Prozesses begünstigt (Pipalia *et al.*, 2011; Wehrmann *et al.*, 2012; Zampieri *et al.*, 2011); es besteht zudem die Möglichkeit, die Zellen in Zellrepositorien verfügbar zu halten und bei Bedarf in Dauerkultur zu überführen.

Fibroblasten stellen auch in dieser Arbeit eines von zwei verwendeten Zellkultursystemen dar. Es sind allerdings fundamentale pathophysiologische Unterschiede zwischen peripheren und neuronalen Zellen bei NP-C bekannt. Es

akkumulieren in Neuronen hauptsächlich Ganglioside (GM2/3) aus endogener Produktion der Zellen anstatt unveresterter, exogen-LDL-abgeleiteter Cholesterole, wie an menschlichen NP-C Dissektaten (Vanier, 1999) und in neuronalen NP-C-Zellmodellen (Trilck *et al.*, 2017) gezeigt werden konnte; axonale Dystrophie, Neurofibrillen und ektope Dendriten stellen pathomorphologische Besonderheiten neuronaler NPC1^{mt}-Zellen dar, die sowohl an murinen wie humanen Sektions-Präparaten nachgewiesen werden konnten (Love *et al.*, 1995; Walkley und Suzuki, 2004). Die Schwere der neurologischen Krankheitsmanifestation bei NP-C gilt zudem als prognosebestimmend für die Betroffenen (Vanier, 2010). Modelle zur Untersuchung der humanen neuronalen NP-C-Pathophysiologie und zur Testung medikamentöser Therapieoptionen sind also von großem Interesse.

Zur Generierung eines humanen neuronalen Modells wurden einerseits Ansätze durch induzierte pluripotente Stammzellen aus NP-C-Patientenzellen beschrieben und andererseits Modelle unter Verwendung von shRNA-bewirkter Herunterregulation des NPC1-Proteins in pluripotenten Stammzellen. Die beschriebenen Modelle, die sich auf die Reprogrammierung von Fibroblasten von NP-C-Patienten stützen (Bergamin *et al.*, 2013; Efthymiou *et al.*, 2015; Maetzel *et al.*, 2014; Trilck *et al.*, 2013, 2016, 2017; Yu *et al.*, 2014) erlauben mutationsspezifische Untersuchungen der Pathophysiologie eines neuronalen NP-C-Phänotyps und die Testung pharmakologischer Interventionen. Hinsichtlich der Beurteilbarkeit epigenetischer Anteile der Erkrankung im Rahmen des reprogrammierten Zellmodells besteht allerdings Unklarheit: durch die Reprogrammierung der Zellen wird von einer Löschung epigenetischer Modifikationen ausgegangen (Qiang *et al.*, 2013), welche wiewohl in Teilen erhalten bleiben mögen (Kim *et al.*, 2010). Weiterhin sind Reprogrammierungs-Ansätze mit sehr großem Aufwand verbunden und von hochspezialisierter Expertise abhängig. Sie stellen somit noch keine breit verfügbare Methode dar. Der in Bergamin *et al.* (2013) beschriebene Ansatz lässt zudem nur die Reprogrammierung früher Passagen der gewonnenen Fibroblasten zu, was die Verfügbarkeit weiter einschränkt.

Zwei Arbeitsgruppen haben humane NP-C-Modelle beschrieben, die auf shRNA-Transfektion in verschiedenen humanen neuronalen Modellsystemen basieren (HUES9 bzw. SH-SY5Y; Ordonez *et al.*, 2012; Rodríguez-Pascau *et al.*, 2012). In beiden Arbeiten wurden shRNA-Transfektionen vorgenommen und stabile NPC1^{kd}-Zelllinien generiert. Die funktionelle Charakterisierung als NPC1^{kd}-Zellen wurde mit Zellfärbungen (Filipin-Färbung, *Lyso-Tracker*; Ordonez *et al.*, 2012) bzw. per Filipin-

Messung und Messung verschiedener Cholesterolfractionen (GM2, unverestertes Cholesterol; Rodríguez-Pascau *et al.*, 2012) vorgenommen. Die in den genannten Publikationen verwendeten Zellsysteme erlauben ähnlich wie die in dieser Arbeit verwendeten hNPZ Rückschlüsse auf die funktionelle neuronale Pathophysiologie von NP-C. Weitere Studien zum hier verwendeten Modell können insbesondere eine biochemische Charakterisierung des NPC1-*knockdown* sowie die Generierung einer stabilen NPC1^{kd}-Zelllinie erbringen.

Die in vorliegender Arbeit verwendeten hNPZ (ReNCell VM) bilden als menschliche neuronale Zellen mit schneller Verdopplungszeit und der Möglichkeit der Differenzierung aus neuronalen Progenitorzellen ein Modellsystem, das funktionale Analysen neuronaler Physiologie und Pathophysiologie erlaubt. Weiterhin lassen sich mittels shRNA-Transfektion (Fire *et al.*, 1998) reproduzierbar spezifische Zielgene beeinflussen. Zudem sind beispielsweise die Untersuchung von Störungen in der Morphogenese neuronaler Zellen (Su und Tsai, 2011; Walkley *et al.*, 1998) und in der Differenzierung von Progenitor- zu adulten Stammzellen (Kim *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006) im Zusammenhang mit NP-C denkbar. Beide Phänomene können neben dem Absterben adulter Neurone Ursachen für Neurodegeneration bei NP-C darstellen und sind in diesem Modell untersuchbar.

1.3 Therapieansätze bei NP-C

1.3.1 Bisherige Therapieansätze

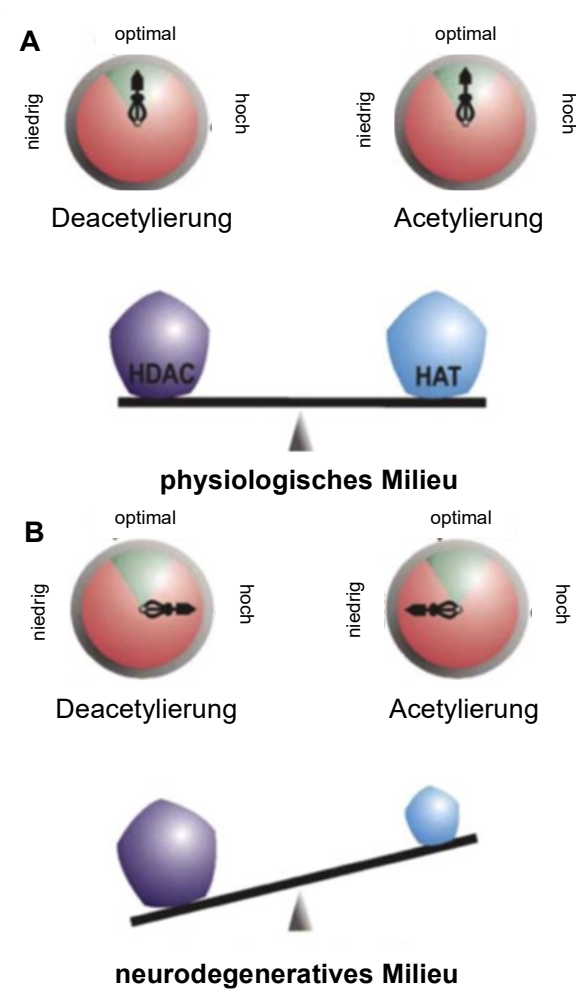
NP-C ist bisher nicht heilbar; bisher etablierte Therapieansätze beschränken sich weitgehend auf symptomatische Linderung, die Krankheitsprogression ist nur eingeschränkt aufzuhalten oder rückgängig zu machen. Seit 2009 ist in der Europäischen Union Miglustat (Zavesca) für die Behandlung progressiver neurologischer Erscheinungsformen von NP-C zugelassen. Es stellt die einzige zugelassene, spezifisch auf NP-C wirkende pharmakologische Intervention dar. Miglustat wirkt über Inhibition der Glukosylceramid-Synthetase. Dadurch wird die Synthetisierung von Glykolipiden inhibiert und das Substrat eines der akkumulierenden Lipide verringert (*substrate reduction therapy*, SRT). Das Medikament konnte in 72% der für ein Jahr behandelten Patienten ein Fortschreiten der neurologischen Manifestationen verhindern (Wraith *et al.*, 2009), allerdings auch keine Besserung bewirken. Insbesondere angesichts der meist erst spät gestellten Diagnose (Garver *et al.*, 2007) stellt dies ein Problem dar. Dem Wirkstoff 2-

Hydroxypropyl- β - Cyclodextrin (HPBCD) wird ebenso therapeutisches Potential zugeschrieben (Camargo *et al.*, 2001) und es werden Kombinationsbehandlungen mit Miglustat (Hovakimyan *et al.*, 2013b) untersucht. HPBCD wirkt über seine molekulare Struktur, die einen Kanal mit einer hydrophilen Außenseite und einer hydrophoben Innenseite bildet und eine hohe Affinität für Sterole aufweist. Es wird ein Wirkmechanismus analog zur eigentlichen Funktion des NPC1-Proteins vermutet (Liu *et al.*, 2009). Es findet derzeit eine klinische Studie für die Indikation NP-C statt⁴. Ein großer Nachteil dieses Wirkstoffs deutet sich neben Hinweisen auf starke Ototoxizität (Crumling *et al.*, 2012) allerdings darin an, dass er die Blut-Hirn-Schranke nur sehr eingeschränkt überwinden kann; dies macht intensive Therapieschemata mit hochdosierter intravenöser Anwendung nötig (Helquist *et al.*, 2013). Intrathekale Anwendung scheint zudem keine verbesserte Wirkung zu ergeben (Camargo *et al.*, 2001). Die Anwendung chemischer Chaperone wie Glycerol oder 4-Phenylbuttersäure birgt nach bisherigen laborexperimentellen Studien an Zellkulturen auch bei NP-C Potential (Gelsthorpe *et al.*, 2008; Rosenbaum und Maxfield, 2011). Bei anderen lysosomalen Speichererkrankungen konnten bereits Hinweise auf die Wirksamkeit von pharmakologischen Chaperonen erbracht werden (DGJ bei Morbus Fabry (Fan *et al.*, 1999), DNJ bei Morbus Pompe (Parenti *et al.*, 2007), Isfagomin und Ambroxol bei M. Gaucher (Khanna *et al.*, 2010; Maegawa *et al.*, 2009). Im Mausmodell erbrachte eine Dreifachkombination aus HPBCD, Vorinostat und dem Chaperon Polyethylenglykol (PEG) bei wöchentlich einer intraperitonealen Injektion verbessertes Überleben von Nervenzellen und eine verdoppelte Überlebenszeit (Alam *et al.*, 2016).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass bisherige Therapieansätze keine zufriedenstellende Kontrolle von NP-C ermöglichen und dass die Entwicklung neuer Wirkstoffe von großem Interesse ist. HDACi bieten in dieser Hinsicht einen vielversprechenden Ansatzpunkt, da epigenetische Dysregulationen als auch beschriebene Faltungsdefekte von HDACi beeinflusst werden können.

1.3.2 HDACi bei NP-C

HDACi konnten bei verschiedenen erblichen Erkrankungen mit Folgen auf die Proteinkonformation wie Zystische Fibrose (Bouchecareilh *et al.*, 2012; Hutt *et al.*, 2010), M. Huntington (Hockly *et al.*, 2003; Steffan *et al.*, 2001), M. Gaucher (Brady *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013, 2014, 2015) und bei NP-C (Pipalia *et al.*, 2011; Praggastis *et al.*, 2015) Hinweise auf eine therapeutische Wirksamkeit liefern.



und

bzw.
 asse
 ivität.
 im
 riert.
 ance
 otein-
 HAT-
 Es
 rung
 nach

ssen
 und
 PC1-

Expression im Wege steht (s. Abbildung 1-4). Zweitens ist das verbleibende NPC1^{mt}-Protein fehlgefaltet und kann seine Funktion als Lipidtransporter im LE/L nicht mehr ausreichend ausführen (vgl. Abbildung 1-5, A). HDACi können die Expression des NPC1-Gens steigern, Faltungsdefekte mindern und damit mehr funktionelles NPC1-Protein verfügbar machen (vgl. Abbildung 1-5, B); es liegen Hinweise dazu vor, dass hierbei epigenetische Mechanismen zugrunde liegen: Trichostatin A (TSA) konnte in murinen adrenalen Tumorzellen unter cAMP-Stimulation vermehrte Histonacetylierung und eine Steigerung der Produktion von NPC1-mRNA bewirken (Gévry *et al.*, 2003). Eine Reihe von HDACi, unter ihnen TSA, konnte im Western Blot nachweisbare Vermehrung von NPC1^{mt}-Protein in verschiedenen Patienten-Fibroblastenzelllinien auslösen (Pipalia *et al.*, 2011). Die Beeinflussbarkeit von Faltungsdefekten durch HDACi wird der Modulation von Chaperonen zugeschrieben.

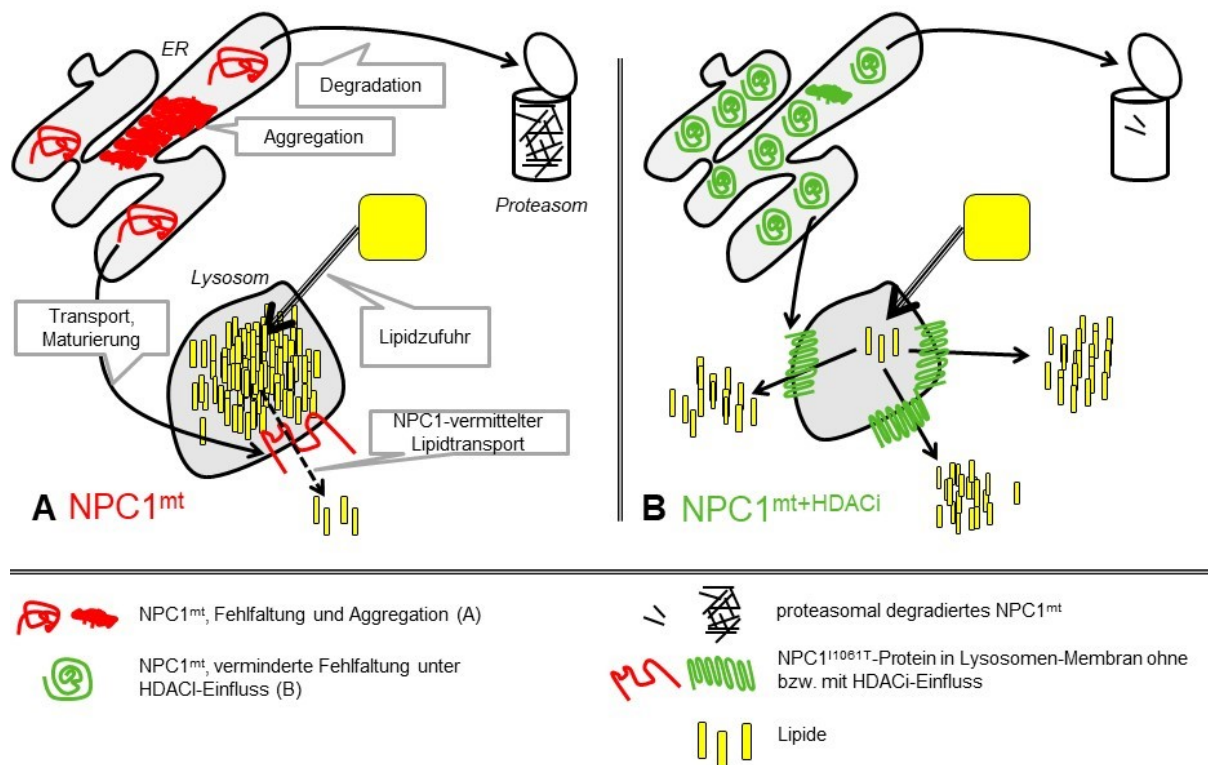


Abbildung 1-5: Mutationen im NPC1-Gen können Proteinfaltungsdefekte verursachen; HDACi zeigen Wirksamkeit gegen NPC1^{mt}-ausgelösten Faltungsdefekt

Modellhafte vereinfachte Darstellung des intrazellulären Raums mit Fokus auf NPC1-vermitteltem zellulären Lipidtransport. **A: Mutation (NPC1^{mt}):** NPC1^{mt}-Protein weist nach Synthesisierung einen Faltungsdefekt auf, neigt zur Aggregation und wird proteasomal degradiert. Nur ein geringer Teil des synthetisierten NPC1^{mt}-Protein kann seine korrekte Lokalisation einnehmen und am Lipidtransport teilnehmen. **B: Anwendung von HDACi (NPC1^{mt} + HDACi):** HDACi steigern die Produktion und mindern den Faltungsdefekt des NPC1^{mt}-Protein durch Modulation von Chaperonen, wodurch eine verminderte lysosomale Lipidakkumulation erreicht wird.

NPC1^{mt} = NPC1-Mutante; NPC1^{mt} + HDACi = NPC1-Mutante nach HDACi-Anwendung; ER = endoplasmatisches Retikulum

Zur Vielzahl von beschriebenen nicht-Histon Zielproteinen von HDACi zählen eine Reihe molekularer Chaperone, unter ihnen GRP78/BiP und Hsp 90 (Yang und Seto, 2007). Baumeister *et al.* konnten die Wirksamkeit des HDACi TSA auf die Induktion des Chaperons GRP78/BiP nachweisen. Die Aufgaben von GRP78/BiP bestehen in der Vermittlung korrekter Faltung und Zusammenfügung von Proteinen sowie in der Markierung fehlgefalteter Proteine für die Degradation im Rahmen einer Reaktion des endoplasmatischen Retikulums. Die Wirkung von TSA konnte in genannter Arbeit in menschlichen kolorektalen Zellkulturen auf eine Derepression des Grp78-Promotoren zurückgeführt werden (Baumeister *et al.*, 2009). Weiterhin demonstrierten Yang *et al.* an Fibroblasten-Kulturen von Patienten mit Morbus Gaucher Typ 1 und 2, dass durch

HDACi die Verfügbarkeit des bei Morbus Gaucher vermindert hergestellten Enzyms Glukozerebrosidase (GCase) erhöht wird. Sie führen dies auf durch HDACi verminderte Deacetylierung des *heat-shock-proteins* 90 (*Hsp90*) zurück. Im acetylierten Zustand sorgt *Hsp90* für die Erkennung und Degradation der durch Mutation fehlgefalteten GCase; vermehrte Inhibition der Deacetylierung bewirkt so erhöhte GCase-Verfügbarkeit (Yang *et al.*, 2013). Verminderte Lipidakkumulation im Filipintest in HDACi-behandelten NPC1^{mt}-Fibroblasten liefert einen entscheidenden Hinweis auf verbesserte Funktionalität des NPC1^{mt}-Proteins (Gelsthorpe *et al.*, 2008; Pipalia *et al.*, 2011).

Neben den beschriebenen potentiellen direkten Einflüssen auf Expression, Maturierung und den korrekten Transport funktionellen NPC1-Proteins in die Lysosomen wird von pleiotropen Effekten von HDACi auf die Auswirkungen des NPC1-Gendefekts ausgegangen. Zu nennen wären vor allem neuroregenerative und -protektive Effekte durch verbesserte Ausreifung neuronaler Zellen (Siebzehnruhl *et al.*, 2007), verminderten oxidativen Stress (Ryu *et al.*, 2003) und verminderte LDL-Aufnahme (Helquist *et al.*, 2013). Befunde der NPC1-Expressionssteigerung bei NPC1-defizienten BALB/c-Mäusen durch den niederpotenten HDACi Valproat lassen außerdem den Schluss zu, dass HDACi unabhängig vom NPC1-Genotyp ihre Wirkung entfalten können (Kim *et al.*, 2007). Im Rahmen einer klinischen Anwendung wären weiterhin die Minderung inflammatorischer Prozesse in Gehirn und Leber (Leoni *et al.*, 2002) und die Förderung kognitiver Leistungen (Helquist *et al.*, 2013) von Vorteil.

2 Fragestellung

NP-C ist bisher nicht heilbar und medikamentöse Therapien erbringen bisher nur mit Einschränkungen befriedigende Ergebnisse. HDACi haben vielfach bei neurodegenerativen (Coppedè, 2014; Kazantsev und Thompson, 2008) und im Speziellen bei der verwandten lysosomalen Speichererkrankung Morbus Gaucher (Lu *et al.*, 2011a; Yang *et al.*, 2013) Beweise für ihr Potential erbracht. Bei NP-C können sie auf den pathophysiologisch zentralen Mangel an funktionellem NPC1-Protein wirken (Gelsthorpe *et al.*, 2008; Pipalia *et al.*, 2011). Bisherige Studien konnten allerdings deren Wirksamkeit auf NPC1 noch nicht in einem menschlichen neuronalen Modell darstellen. Der Ansatz der vorliegenden Arbeit erlaubt erstmals eine Einschätzung der Wirksamkeit eines HDACi für die klinisch-prognostisch bedeutsame neuronale Ebene von NP-C in einem menschlichen Zellkulturmodell.

Die Testung von TSA als bedeutsamer Vertreter der HDACi fand vor dem Hintergrund bestehender Erfahrungen in unserem Labor mit *small-molecule-drugs* zur Behandlung lysosomaler Speichererkrankungen (Lukas *et al.*, 2014; Maass *et al.*, 2014; Trilck *et al.*, 2013) und den dazu verwendeten humanen neuronalen Progenitorzellen (hNPZ; Mußmann *et al.*, 2014) statt. Weiterhin besteht Expertise zu Pathologie und Pathophysiologie von NP-C (Avchalumov *et al.*, 2012; Hovakimyan *et al.*, 2013a; Yan *et al.*, 2011, 2014b, 2014a) sowie in der Entwicklung weiterführender NP-C Krankheitsmodelle (Trilck *et al.*, 2013, 2016, 2017). Das Ziel dieser Arbeit stellte die Testung von TSA im vorher selbst etablierten humanen neuronalen NP-C Modell dar.

Die nachgenannten Fragen wurden im Speziellen untersucht:

- Welchen Effekt hat TSA auf das NPC1-Protein in Patienten-Fibroblasten?
- Wie effektiv wirken zwei shRNA – Konstrukte im Vergleich in der Etablierung eines NP-C – Modellsystems in menschlichen neuronalen Vorläuferzellen (hNPZ) mittels Nukleofektion?
- Kann TSA nach shRNA-vermittelter NPC1-Herunterregulation die NPC1-Protein-Expression erhöhen?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien⁵

3.1.1 Technische Anlagen und Maschinen

	System	Hersteller
Analysewaage	MCBA 100	Sartorius, Göttingen
Heizblock	Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Inkubator		Binder, Tuttlingen
Kamera	DS2M	Nikon, Kingston, Vereinigtes Königreich
Kamera-Objektiv	Plan Fluor Ph1DL	Nikon, Kingston, Vereinigtes Königreich
Kühlzentrifugen	Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen
	Universalzentrifuge Z383K	Hermle, Wehingen
Nukleofektions-Gerät	Nucleofector II	Amaza, Lonza, Köln
pH-Meter		Mettler Toledo, Gießen
Pipetten	Reference	Eppendorf, Hamburg
Plattenleser	Magellan	Tecan, Crailsheim
Schüttelinkubator	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
SDS-PAGE-Kammern	Criterion Precast Gel, Tris 4-15%	Biorad, München
<i>semi-dry-transfer</i> -Kammer	Trans-Blot SD	Biorad, München
Spannungsquelle	PowerPacHC	Biorad, München
sterile Werkbank	Antares 48	Heraeus, Berlin
Tischzentrifugen	Mikroliterzentrifuge Z233MK-2	Hermle, Wehingen
Vortexer	MS1 IKA	Sigma-Aldrich, Hamburg

Western-Blot Scanner	Infrarot-	Odyssey Infrared Imaging System	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
Zellkultur-Mikroskop		Eclipse TS100	Nikon, Kingston, Vereinigtes Königreich
Zellzähler		CASY	Roche, Mannheim
Zentrifugen		Z383K	Hermle, Wehingen
		Z233MK-2	Hermle, Wehingen
		Universal 30RF	Hettich, Tuttlingen

Tabelle 1 - technische Anlagen und Maschinen

3.1.2 Software

Plattenleser: Magellan Data Analysis Software, Tecan, Crailsheim

Western-Blot-Auslesung: Odyssey V1.2, Licor Biosciences, Bad Homburg

Datenverarbeitung: Office 2011, 2016 (Word, Excel, Powerpoint): Microsoft, USA

Literaturrecherche: NCBI Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Scopus Database (<http://www.scopus.com/>), Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.org/>),

Uniprot Database (<http://www.uniprot.org>)

3.1.3 Verbrauchsgüter

Der Bezug von Plastik- und Verbrauchsmaterialien erfolgte über folgende Firmen: Braun, Melsungen; Eppendorf, Hamburg; Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg; Greiner, Solingen; Sarstedt, Nümbrecht; Roth, Karlsruhe.

Criterion Precast Gel	BioRad, München
Handschuhe, Nitril	Kimberly-Clark, Koblenz
Nitrozellulosemembran, Hybond-ECL	Amersham, Freiburg
Pipettenspitzen 10, 100, 1.000µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15, 50ml	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Whatman Filterpapier 58 x 58cm	GE Healthcare, Dassel

Material und Methoden

Zellkulturschalen mit 6, 24, 48, 96 Kavitäten	Greiner Bio-One, Solingen
Zellkulturflasche T75	Greiner Bio-One, Solingen
Zellkulturpipetten 5, 10, 25ml	Greiner Bio-One, Solingen

3.1.4 Chemikalien, Puffer

Routinemäßig genutzte Chemikalien mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* wurden von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Hamburg) und Roth (Karlsruhe) erworben, sofern nicht anders vermerkt. Trichostatin A wurde von Sigma Aldrich, Hamburg (Best. Nr. T8552, CAS RN 58880-19-6) bezogen.

RIPA-Puffer (Lysepuffer für Zellextrakte)

- 20mM Tris pH 7,4
- 137mM NaCl
- 0,1% SDS
- 0,1% Natriumdesoxycholat
- 1% Triton X-100
- 10% Glycerol
- 2mM EDTA
- 1mM EGTA
- 1mM NaF
- 20mM Natriumpyrophosphat
- Protease- und Phosphataseninhibitor-Mischung (Roche, Mannheim)

PBS

- 137nM NaCl
- 2,7nM KCl
- 8,1nM Na₂HPO₄
- 1,5nM KH₂PO₄

Lämmli-Puffer (Probenauftragspuffer für Western Blot-Analysen)

- 6,25ml Tris
- 10ml Glycerol
- 5ml 20% SDS-Lösung
- 2,5ml Mercaptoethanol
- 5ml 1% Bromphenolblau

- 21,25ml Aqua dest.

10x SDS- Elektrophorese-Puffer

- 30,3g Tris
- 141g Glycin
- 10g SDS
- mit Aqua dest. auf 1l aufgefüllt

SDS-Transferpuffer:

- 5,82g Tris
- 2,93 g Glycin
- 3,75ml 10 % SDS solution (50g SDS in 500ml aqua dest)
- 200ml methanol
- mit Aqua dest. auf 1l aufgefüllt

10x TBS:

- 10,42g Tris-HCl
- 87,66g NaCl
- mit Aqua dest. auf 1l aufgefüllt, auf pH 7,5 eingestellt

TBST:

- 100ml 10xTBS
- 900ml Aqua dest.
- 1ml Tween 20

Magermilch-Blockier-Puffer:

- 3g Puder entrahmter Milch
- 100ml TBST

Bovinserum-Blockier-Puffer:

- 2g BSA
- 100ml TBST

3.1.5 Zellkulturmedien, -puffer, -supplemente sowie Zusätze

B27	Invitrogen, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
bFGF	Roche, Mannheim
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 4,5g/l Glukose	Invitrogen, Darmstadt

Material und Methoden

DMEM/F12	Invitrogen, Darmstadt
EGF	Roche, Mannheim
FBS (fetales bovines Serum)	PAA, Laboratories, Cölbe
Gentamicin	Invitrogen, Darmstadt
GlutaMax	Invitrogen, Darmstadt
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Invitrogen, Darmstadt
Heparin-Natrium-Salz	Invitrogen, Darmstadt
Humanes Serum-Albumin	Grifols, Frankfurt a. M.
Maus-Laminin	Trevigen, Gaithersburg, USA
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA Laboratories, Cölbe
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trypsin-Inhibitor/Benzonase-Lösung	1% HSA, 25U/ml Benzonase, 0,55 mg/ml Trypsin-Inhibitor in DMEM/F12
Trypsin/Benzonase-Lösung	25U/ml Benzonase in Trypsin-EDTA

3.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper

NPC1; polyklonal (Hase), ab36983, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich (1:500)

GAPDH; monoklonal (Maus), ab8245, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich (1:10.000)

Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor 680, goat-anti-rabbit, A-21076, Invitrogen, Darmstadt (1:10.000)

IRDye 800CW, goat-anti-rabbit, Rockland 611-131-121, BIOMOL, Hamburg (1:10.000)

3.1.7 Reaktionskits

Amaya Nucleofector Kit V, VCA-1003, Amaya, Lonza, Köln

Bicinchoninsäureassay, Katalog-Nr. 23225, Pierce, Thermo-Scientific, Rockford, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle in der Folge genannten Zellkulturen wurden im Inkubator unter Kultivierungsbedingungen von 37°C Temperatur, 20% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid durchgeführt; diese Kulturbedingungen werden im Text deshalb nicht erneut genannt.

3.2.1.1 *Kultivierung humaner Fibroblastenlinien*

Die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten-Zelllinien wurden vom Coriell Institute (Camden, USA; <https://catalog.coriell.org>) bezogen. Es wurden sowohl Wildtyp- (GM05659) als auch zwei NPC1-mutierte Linien verwendet (GM03123, GM18436).

Die Kontroll-Zelllinie GM05659 entstammt der Brust eines einjährigen, hellhäutigen, gesunden Probanden und zeigt keine relevanten Veränderungen hinsichtlich Zellmorphologie, Lipidakkumulation und NPC1-Expression (Appelqvist *et al.*, 2012; Pipalia *et al.*, 2011).

Die Zelllinie GM03123 wurde aus dem Unterarm einer neunjährigen kaukasischen NP-C-Patientin gewonnen. Die komplex-heterozygote NPC1-Mutation führt zu einer NPC1-typischen Beeinträchtigung der Veresterung von Cholesterol, welche sich in der Filipin-Färbung in einem perinukleär-vesikulären Akkumulationsmuster unveresterten Cholesterols niederschlägt. Beide NPC1-Allele tragen eine *missense*-Mutation mit der Folge einer Aminosäuresubstitution: ein Allel trägt im Exon 6 an Nukleotid 709 Thymin statt Cytosin (c.709 C>T) mit der Folge einer Substitution von Prolin zu Serin an Codon 237 (P237S); das zweite trägt im Exon 21 an Nukleotid 3182 Cytosin statt Thymin (c.3182 T>C) mit daraus folgendem Tausch von Isoleucin zu Threonin an Codon 1061. Diese auch unter der Abkürzung I1061T bekannte Mutation ist insbesondere in Westeuropa die häufigste und mit dem schwerwiegenden juvenilen Typ des NP-C assoziiert (Millat *et al.*, 1999).

Die Zelllinie GM18436 entstammt einem einjährigen hellhäutigen NP-C-Patienten mit typischen neuroviszeralen Symptomen; die Probe wurde ebenfalls aus dem Unterarm gewonnen. Die gemischt-heterozygote Mutation bedingt in der Filipin-Färbung das NP-C typische Akkumulationsmuster (Appelqvist *et al.*, 2012). An Nukleotid 1836 des NPC1-Proteins führt in Exon 10 eine Substitution von Adenin für Cytosin (c.1836A>C) zu einer *missense*-Mutation in Codon 612 (Asparaginsäure statt Glutaminsäure, (E612D)). Die Deletion eines Basenpaares an Nukleotid 1628

(c.1628delC) in Exon 17 führt im zweiten Allel zu einer *frameshift*-Mutation an Codon 542 (F542fsX).

Die Kultivierung der genannten Zelllinien fand in Zellkulturmedium auf DMEM-Basis mit Zusatz von 10% FBS, 1U/ml Penicillin und 1µg/ml Streptomycin statt. Die Ernte der Zellen wurde bei etwa 100% Konfluenz mittels Inkubation in 0,25% Trypsin/EDTA für fünf Minuten durchgeführt. Nach Hinzufügen von Medium zum Stoppen der Reaktion wurde die in Reagenzgefäße überführte Zellsuspension für fünf Minuten bei 2.000g zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen, das gewonnene Zellpellet in Medium resuspendiert, mittels CASY-Zellzähler die Zellzahl bestimmt und eine definierte Zellzahl in Kultivierungsgefäße ausgesät (s. weiter unten). In Experimenten zur Untersuchung des Einflusses des Histondeacetylaseinhibitors (HDACi) Trichostatin A (TSA) wurde TSA in DMSO verdünnt und in bei den jeweiligen Experimenten genannten Konzentrationen verwendet. DMSO wurde in entsprechender Konzentration als Kontrolle verwendet.

3.2.1.2 Kultivierung von ReNCell VM-Zellen

Die Untersuchungen an neuronalen Zellen erfolgten am Zellmodell der ReNCell VM-Zellen (ReNeuron, Guildford, Vereinigtes Königreich, geliefert durch Millipore, Schwalbach). Diese humanen neuronalen Progenitorzellen (hNPZ) wurden dem ventralen Mesencephalon eines zehn Wochen alten menschlichen Fötus entnommen und retroviral durch v-Myc-Transduktion immortalisiert. Die Stammzellen weisen dadurch hohe Verfügbarkeit (durchschnittliche Verdopplungszeit 30h) bei erhaltenem Differenzierungspotential in verschiedene neuronale Zelltypen auf (Donato *et al.*, 2007; Mußmann *et al.*, 2014). Zur Kultivierung einer adhärennten Einzelschicht werden Kultivierungsgefäße mit 1% Laminin (1mg/ml, Trevigen, Gaithersburg, USA), verdünnt in eiskaltem DMEM/F12 (Invitrogen, Darmstadt), beschichtet. Vor dem Aussäen der Zellen wurde der Schalenboden mit vorgewärmtem DMEM/F12 gewaschen. In der Dauerkultur wurden die Zellen in Proliferationsmedium (B27-Zellmedium mit Zusatz von *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *epidermal growth factor* (EGF)) bis zu 80% Konfluenz kultiviert. Zur Ablösung der Zellen vom Schalenboden wurden sie für drei Minuten bei 37°C mit Trypsin/Benzonase inkubiert, danach Trypsininhibitor/Benzonase hinzugefügt, um die Reaktion zu stoppen. Die Zellsuspension wurde anschließend für fünf Minuten bei 2.000g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das resultierende Zellpellet wurde mit Proliferationsmedium resuspendiert und dann die Zellzahl mittels CASY-Zellzähler (s. Abschnitt 3.2.1.3)

ermittelt. Anschließend erfolgte die Aussaat in Zellkulturplatten beziehungsweise die Transfektion (s. Abschnitt 3.2.1.4). Die Differenzierung der Zellen wurde durch Mediumwechsel auf ein wachstumsfaktorfreies Medium (Differenzierungsmedium) angestoßen.

3.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl von Zellsuspensionen wurde mittels CASY-Zellzähler (Roche, Mannheim) durchgeführt. Hierzu wurden die zuvor trypsinisierten und abzentrifugierten Zellen in einem definierten Volumen Zellkulturmedium aufgenommen. Typischerweise wurden 50µl Zellsuspension in einem Volumen von 10ml CASYton-Elektrolytlösung verdünnt, um einer Verstopfung der Kapillare vorzubeugen und mit einem dem Zelltyp entsprechend kalibrierten Programm gemessen.

3.2.1.4 Plasmidkonstrukt; Transfektion der Zellen

Die NPC1-Herunterregulation bei hNPZ erfolgte vermittelt shRNA-Transfektion (Fire *et al.*, 1998). Als Grundstruktur für die shRNA-Konstrukte diente der Vektor pG-SHIN2, der einen humanen H1- und SR- α -Promotor enthält (s. Abbildung 3-1). Der H1-Promotor dient der Expression der NPC1^{kd}-Oligonukleotidsequenz. Er bedient sich der Polymerase III, dessen Transkripte in menschlichen Zellen sehr verbreitet sind und daher verlässliche shRNA-Produktion durch die transfizierte Zelle erlauben (Brummelkamp *et al.*, 2002). Die Polymerase III sorgt für die Synthese verschiedener nukleärer und zytoplasmischer nicht-kodierender RNA. Der SR- α -Promotor besteht aus dem *early simian-virus* 40 (SV40) Promotor und Teilen des humanen T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1 (Takebe *et al.*, 1988). Er dient der Expression des Proteins GFP (*green fluorescent protein*), durch dessen Fluoreszenz unter UV-Licht die Kontrolle der erfolgreichen Transfektion möglich ist.

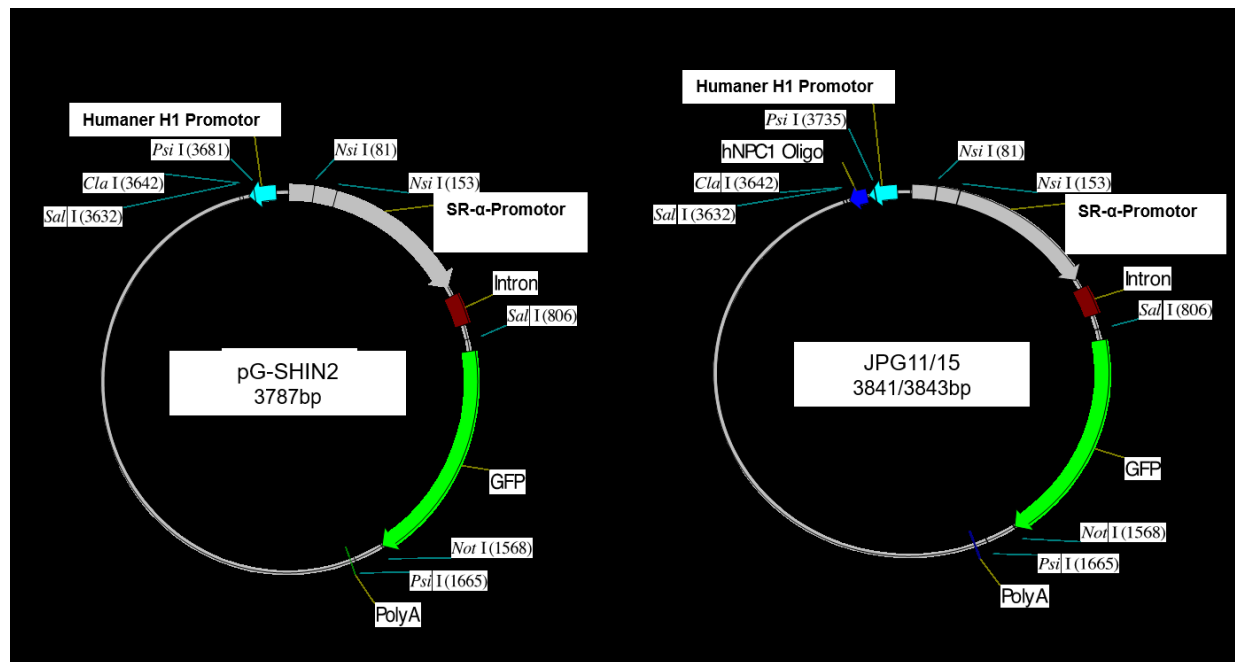


Abbildung 3-1: Vektorkarten der verwendeten Plasmid-Konstrukte pG-SHIN2 (A, Kontrolle) und JPG11 und -15 (B, NPC1-Herunterregulationskonstrukte)

bp = Basenpaare; hNPC1 Oligo = NPC1^{kd}- Oligonukleotidsequenz

Typischerweise wurden 10^6 Zellen (Fibroblasten bzw. hNPZ) in einem Volumen von 100 μ l Nukleofektionslösung (Lonza, Köln) resuspendiert, welches zuvor mit 2 μ g des Plasmidkonstrukts versetzt wurde und anschließend in eine Transfektionsküvette überführt. Die Transfektion wurde mittels Nucleofector II (Amaza, Lonza, Köln) nach Herstellerangaben durchgeführt, anschließend 500 μ l Proliferationsmedium hinzugefügt und schließlich 350.000 Zellen pro Vertiefung in entsprechend vorbereitete Kultivierungsgefäße überführt.

3.2.2 Proteinanalyse

3.2.2.1 Herstellung der Gesamtzelllysate

Die Proteinanalyse wurde an Gesamtzelllysaten durchgeführt. Die Zellen wurden zuerst mit HBSS, dann mit PBS gewaschen, anschließend wie oben beschrieben entsprechend der jeweiligen Zelllinie geerntet und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 2.000g wurde das verbleibende Zellpellet in eiskaltem RIPA-Puffer, welcher Phosphatase- und Proteaseinhibitoren (Roche, Mannheim) enthält, lysiert und für zehn Minuten inkubiert. Zur Proteinmessung wurde der Überstand verwendet, welcher nach viertelstündiger Zentrifugation bei einer Temperatur von 4°C und 19.500g entstand.

3.2.2.2 Proteinmessung

Die Proteinmessung wurde mittels des Bicinchoninsäure-Assays (BCA, Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt. Hierbei wurde zuerst eine Verdünnung der nach obiger Methode geernteten Zellen hergestellt: für VM-Zellen eine 1/10, für Fibroblasten eine 1/5 Verdünnung. Zu 10µl der Verdünnung wurden 200µl BCA-Reagens hinzugefügt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach konnte mittels eines Photometers (Tecan, Crailsheim) bei 570nm Wellenlänge die Absorption der Probe gemessen werden, welche in linearer Beziehung mit der Proteinkonzentration steht. Anhand einer bovinen Serum-Albumin (BSA)-Konzentrationsreihe konnte die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden. Das Verfahren beruht auf der Reaktion des BCA mit einwertigen Kupferionen: In Anwesenheit von Proteinen werden zweiwertige in einwertige Kupferionen umgewandelt, welche dann mittels des Photometers quantifiziert werden können.

3.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gesamtzelllysate wurden 5:1 mit Probenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Währenddessen wurde eine Elektrophoresekammer mit einem vorgefertigten SDS-PAGE Gel mit 4-15% Tris-HCl (Criterion Precast, Bio-Rad, München) bestückt und mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Anschließend konnten die denaturierten Gesamtzelllysate auf das Gel aufgetragen werden. Durch das Detergens SDS erhalten alle Proteine eine negative Ladung, welche eine Auftrennung der Proteine nach Größe durch die Siebwirkung des Polyacrylamid-Gels ermöglicht. Die Elektrophorese wurde für zehn Minuten bei 100V, danach für 50 Minuten bei 200V durchgeführt. Zur Vermeidung von Hitzeartefakten wurde die Elektrophoresekammer hierbei von außen durch ein Eiswasserbad gekühlt.

3.2.2.4 Western Blot

Zum Transfer der Proteine vom SDS-PAGE Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) wurde ein Semi-Dry Blotting System (Trans-BlotSD, Bio-Rad, München) genutzt. Nach der Elektrophorese wurden Whatman-Paper (GE Healthcare, Dassel), Nitrozellulosemembran und das Gel für fünf Minuten in je eigene Gefäße mit SDS-Transferpuffer gelegt. In der Blotkammer wurden auf die Anode zuerst Whatman-Paper, dann die Nitrozellulosemembran, dann das SDS-PAGE Gel und zuletzt noch ein Whatman-Paper geschichtet. Der Stapel wurde mit ein

wenig SDS-Transferpuffer begossen und schließlich die Kathode der Blotkammer installiert. Für 90 Minuten vollzog sich nun bei 100mA die Übertragung der Proteine vom SDS-Page Gel auf die Nitrozellulosemembran. Nach deren Abschluss wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde in 3% Milchlösung geblockt, danach zweimal für fünf Minuten mit TBST gewaschen. Der Primärantikörper wurde dann in der jeweils im Materialenteil angegebenen Konzentration in 2% BSA-Lösung verdünnt und mit der Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C bei gleichmässigem Schütteln inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für fünf Minuten in TBST gewaschen. Der fluoreszente Sekundärantikörper wurde im Verhältnis 1:10.000 in 2% BSA-Blockierlösung verdünnt und nach Entfernung des TBST der Nitrozellulosemembran hinzugefügt. Es schloss sich eine Inkubation im Dunklen unter gleichmässigem Schütteln für 90 Minuten an. Danach wurde die Membran wiederum dreimal für je fünf Minuten mit TBST gewaschen und getrocknet. Zuletzt konnte sie dann mittels Odyssey-Infrarotscanner ausgewertet werden. Die Normalisierung der Quantifizierungsergebnisse der Banden der jeweiligen Proteine erfolgte am *housekeeping*-Protein GAPDH.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Histondeacetylaseinhibitors (HDACi) Trichostatin A (TSA) auf das Protein NPC1 untersucht. In einem etablierten Krankheitsmodell (Fibroblasten von Morbus Niemann-Pick-C1 (NP-C) Patienten) wurde nachgewiesen, dass der zelluläre NPC1-Gehalt in Patientenlinien im Vergleich zur Wildtyplinie reduziert war. Hierbei konnte demonstriert werden, dass diese Wirkung mutationsunabhängig in beiden Zelllinien auftrat. Anschließend wurde durch den HDACi TSA eine Vermehrung der zellulären NPC1-Protein-Menge erreicht. Die Etablierung eines humanen zentralnervösen Zellkulturmodells ist in dieser neurodegenerativen Erkrankung von besonderem Interesse; die Generierung induzierter pluripotenter Stammzellen (IPS) als Patienten-abgeleitetes neuronales Modell ist jedoch mit enormem Aufwand verbunden (Trilck *et al.*, 2013, 2016). In vorliegender Studie wurde mittels shRNA-Transfektion ein humaner neuronaler NP-C-Phänotyp etabliert, der im Western Blot auf eine signifikante Verminderung der NPC1-Expression schließen lässt. Auch in diesem neuronalen Modell führte die Behandlung mittels TSA zu einer signifikanten Erhöhung zellulären NPC1 Proteins. Dieses Zellkulturmodell eröffnet Perspektiven für die Untersuchung von Gangliosidakkumulation, Zelldifferenzierungs- und Zellmigrationsprozessen in einem menschlichen neuronalen Modell mit NP-C-Phänotyp. Die in dieser Arbeit gefundenen Anzeichen für die Wirksamkeit eines HDACi auf die NPC1-Verfügbarkeit in menschlichen neuronalen Zellen berechtigen zu Hoffnungen auf einen therapeutischen Einsatz dieser Wirkstoffklasse bei NP-C.

4.1 TSA-Effekt auf Fibroblasten

Um den Effekt der NPC1-Mutationen der Zelllinien GM03123 und GM18436 auf das NPC1-Protein nachzuweisen, wurden Zellkulturen entsprechend Abbildung 4-1 und Abschnitt 3.2.1.1 angelegt. Die Zellen wurden in 6-Kavitäten-Zellkulturplatten in einer Zelldichte von 250.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bis zum Erreichen von etwa 100% Konfluenz der Zellen in DMEM/10%FBS-Zellkulturmedium. Anschließend wurde die Ernte wie oben erläutert durchgeführt und die Zellzahlen ermittelt. Das Zellüberleben war durch die NPC1-Mutationen in NPC1^{mt}-Zelllinien nicht eingeschränkt (Daten nicht gezeigt). Die Anwendung von TSA erbrachte bei allen Zelllinien verschlechterte Viabilität (GM03123: 59,9±7%, GM05659: 68,8%, GM18436: 78,5±12%, s. Abbildung 4-2).

Ergebnisse

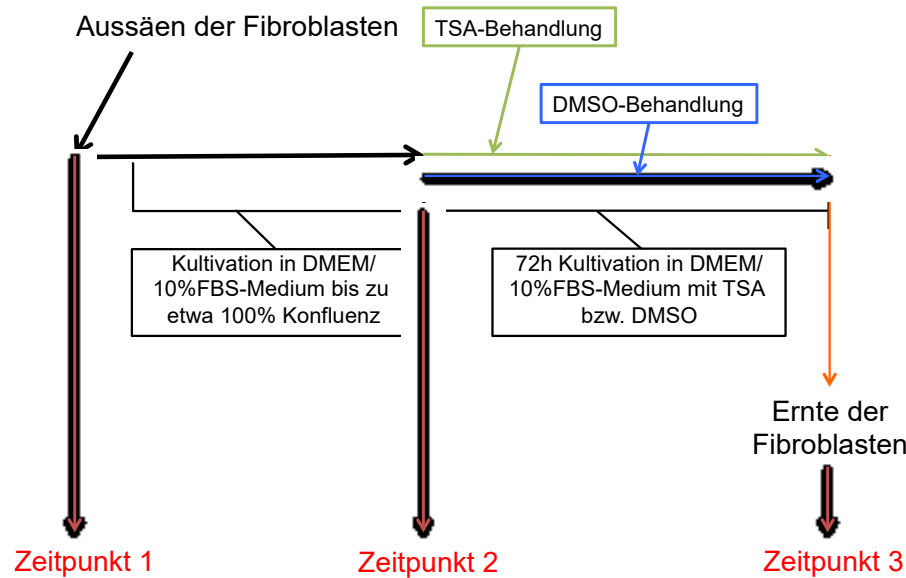


Abbildung 4-1: Kultivierungsschema für Fibroblasten

Es wurden je 112ng/ml DMSO bzw. TSA verwendet (DMSO: 1433nM, TSA: 370nM).

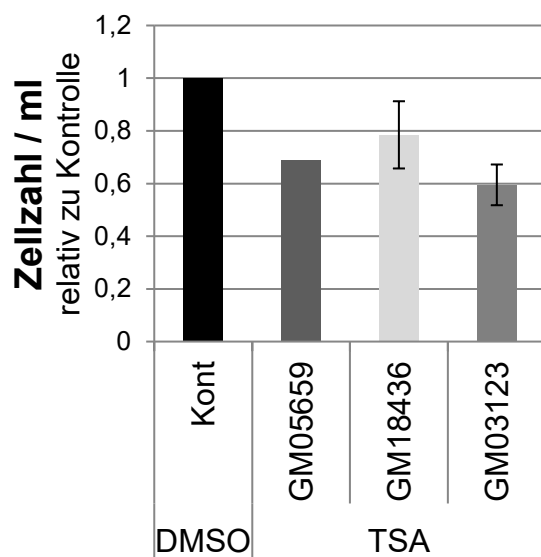


Abbildung 4-2: Zellüberleben bei Fibroblasten nach TSA-Inkubation

Das Zellüberleben war durch TSA-Inkubation eingeschränkt.

GM05659 = Wildtyp; GM03123, GM18436 = NPC1-Mutante; Kont = Kontrolle, jeweilige Zelllinie DMSO-behandelt; TSA/DMSO = Behandlung entsprechend Abbildung 4-1

Nach Gewinnung der Gesamtzelllysate wurden diese auf ihren zellulären NPC1-Gehalt mittels Western Blot untersucht (s. Abbildung 4-3). Es konnte eine Verminderung der NPC1-Bandenintensität in NPC1^{mt}-Zelllinien im Vergleich zur NPC1^{wt}-Zelllinie bestätigt werden. Alle beschriebenen NPC1-Banden ab 140kDa bis circa 200kDa zeigten in NPC1^{mt}-Zelllinien eine homogene Abschwächung. Diese Abschwächung stellt sich in allen Reifungsformen des Proteins zwischen circa 140-180kDa dar. Die NPC1-Fraktion in NPC1^{mt}-Fibroblasten wurde im Vergleich zur mit DMSO als Vehikelkontrolle behandelten Wildtypzelllinie GM05659 ermittelt und lag in Zelllinie GM18436 bei $20,1 \pm 9,6\%$, in Zelllinie GM03123 bei $15,1 \pm 6,5\%$

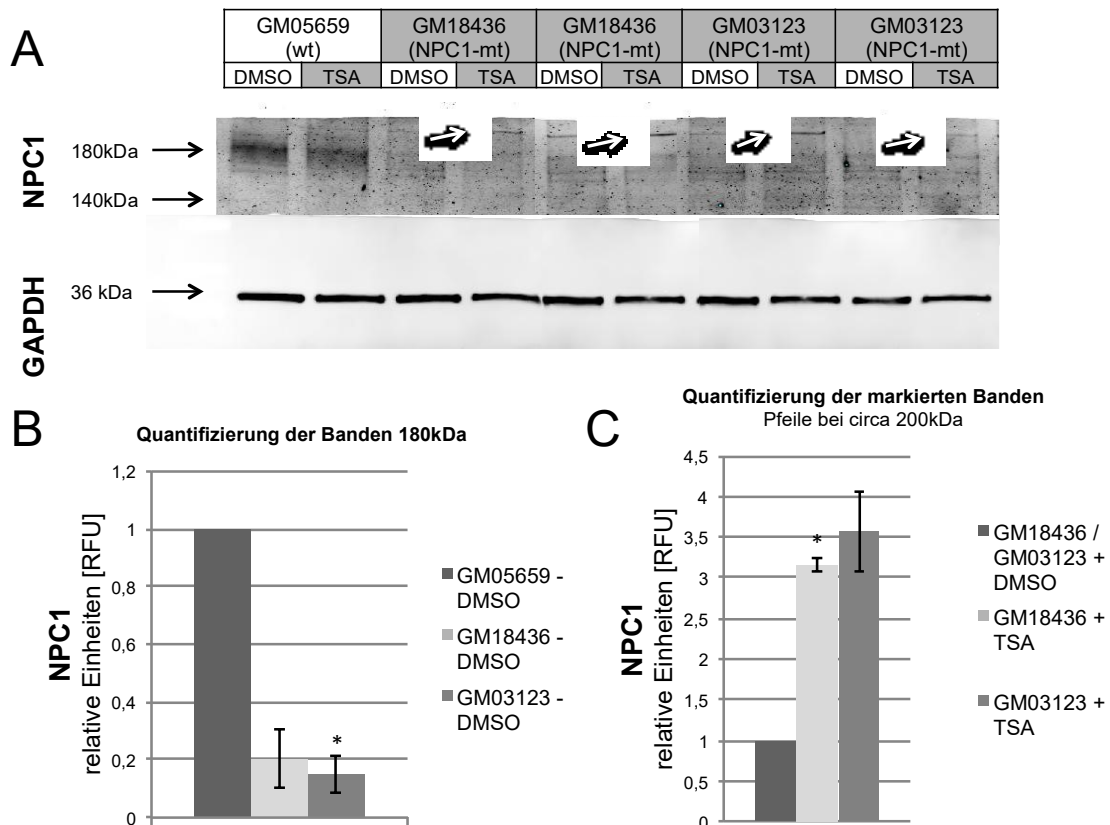


Abbildung 4-3: NPC1-Banden in NPC1^{mt}-Fibroblasten sind stark abgeschwächt, TSA verstärkt NPC1-Antikörper-immunreaktive Fraktion bei 200kDa

A: Western Blot TSA-behandelter Fibroblasten-Gesamtzelllysate. Ernte nach Kultivierung bis etwa 100% Konfluenz und Behandlung mit je 112ng/ml DMSO (1433nM) beziehungsweise TSA (370nM) für 72h. Anschließend Herstellung der Gesamtzelllysate, Western Blot und Quantifizierungen. Die Bande des NPC1-Proteins ist in Mutanten-Fibroblasten stark reduziert (Spalten „DMSO“). Behandlung mit TSA kann die NPC1-Banden zwischen 140kDa und 180kDa nicht versetzen (Spalten „TSA“). Allerdings findet sich bei 200kDa eine NPC1-Antikörper-immunreaktive Proteinfraction, welche verstärkt in TSA-behandelten Zellen auftritt (s. Pfeile; n=2 für NPC1^{mt}-Zelllinien, n=1 für NPC1^{wt}-Zelllinie).

unten: Quantifizierungen obiger Western Blots (n=2 für jede Mutanten-Zelllinie, n=1 für Wildtyp-Zelllinie). **B:** Quantifizierung der NPC1-spezifischen Western Blot Banden der reifen NPC1-Proteinfractionen zwischen circa 170-190kDa, NPC1-Mutanten-Fibroblasten relativ zum Wildtyp; **C:** Quantifizierung der 200kDa NPC1-Banden (Pfeile) der TSA-behandelten Mutanten-Fibroblasten relativ zur DMSO-Kontrolle (B, C: n=2, p*≤0,05).

wt = Wildtyp (GM05659); NPC1-mt = NPC1-Mutante (GM03123, GM18436); TSA/DMSO = Behandlung entsprechend Abbildung 4-1; RFU = *raw field units* wie per Infrarotscanner ermittelt. Zur besseren Vergleichbarkeit der Western Blot-Bilder wurden per Bildbearbeitungssoftware Intensitätsanpassungen vorgenommen.

(s. Abbildung 4-3A (Spalten „DMSO“) und Quantifizierungen in B). TSA ist für seine NPC1-restituierende Wirkung bekannt und wurde von Pipalia *et al.* (Pipalia *et al.*, 2011) auch in der NPC1^{mt} Fibroblastenzelllinie GM03123 untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit zusätzlich verwendete Zelllinie GM18436 weist andere Mutationen auf (vgl. Abschnitt 3.2.1.1) und bietet so die Möglichkeit, den Einfluss von TSA auf unterschiedliche Mutationen zu beurteilen. In o. g. Arbeit von Pipalia *et al.* (2011) konnten bei einer TSA-Konzentration von 370nM und 72h Inkubationszeit die ausgeprägteste Verminderung zellulären Cholesterols nachgewiesen werden. In der hier zunächst angestrebten Reproduktion der Befunde bezüglich eines erhöhten zellulären NPC1-Gehalts durch TSA konnte in beiden NPC1^{mt}-Zelllinien nur in einer NPC1-Antikörper-immunreaktiven Fraktion bei 200kDa eine Verstärkung nachgewiesen werden, während die Fraktionen bei 140 und 180kDa unverändert schwach gegenüber dem Wildtyp blieben. In der 200kDa-Fraktion ist allerdings ein reproduzierbarer Zuwachs der Bandenintensität um das 3,2- (GM18436; $\pm 0,08$) beziehungsweise um das 3,6-fache (GM03123, $\pm 0,49$; s. Pfeile in Abbildung 4-3A und Quantifizierung in C) festzustellen.

Die Steigerung der NPC1-Antikörper-immunreaktiven Bande bei 200kDa kann als Resultat der Behandlung mit TSA angesehen werden, wobei insbesondere höhermolekulare Banden um 210kDa als responsiv beschrieben werden (Pipalia *et al.*, 2017). Watari und Kollegen berichteten von vielfacher N-Glykosylierung für das Protein NPC1, welche das Auftreten verschiedener Proteinfractionen über 180kDa erkläre (Watari *et al.*, 1999a). Bei NPC1^{mt}-Zellen wurde wiederum ein Mangel an höhermolekularen Proteinspezies beschrieben, wozu mangelnde Ausreifung und verkürzte Halbwertszeiten des NPC1^{I1061T}-Proteins führten (Gelsthorpe *et al.*, 2008). Das gleichartige Auftreten dieser Bande in beiden Fibroblasten-Zelllinien kann ein Hinweis darauf sein, dass die Wirkung von TSA auf verschiedene mutante Proteinformen übertragbar und nicht auf NPC1^{I1061T} beschränkt ist (Zampieri *et al.*, 2011).

4.2 NPC1-Herunterregulation bei hNPZ

Nach der Testung von TSA auf NPC1^{mt}-Fibroblasten wurde die Übertragung des Befundes in ein Zellkulturmodell humaner neuronaler Stammzellen angestrebt. Zur Herstellung eines NP-C-Phänotyps in diesen menschlichen neuronalen Zellen wurden Transfektionen mittels Nukleofektion von shRNA-Konstrukten vorgenommen (engl.

knockdown, NPC1^{kd}). Diese tragen Oligonukleotide, die in ihrer Basenfolge komplementär zu ausgewählten Teilen der NPC1-Gensequenz sind und so Degradation der zellulären NPC1-mRNA bewirken und deren Translation verhindern. Daraus entsteht ein funktioneller Mangel an NPC1-Protein, welcher als Modell für NP-C dienen kann.

Auf Basis oben genannter Grundstruktur des Plasmidkonstrukts (vgl. Abschnitt 3.2.1.4, Abbildung 3-1) entstanden durch Integration zweier verschiedener Oligonukleotidsequenzen ⁶ zwei NPC1-Herunterregulationskonstrukte (JPG11, JPG15). JPG11 wurde mithilfe des *siRNA-target-finder* ⁷ (Genscript, Piscataway, USA) entworfen und von Dr. J. Luo bereitgestellt; die Oligonukleotidsequenz zu JPG15 wurde in einem *high-throughput-screening* durch Arora *et al.* (Arora *et al.*, 2010) beschrieben. Die Synthetisierung erfolgte durch einen kommerziellen Anbieter (MWG, Berlin). Als Kontrolle wurde in Transfektionsexperimenten der leere Vektor pG-SHIN2, *i. e.* der Vektor ohne Oligonukleotidsequenz, transfiziert.

Die Transfektion der hNPZ wurde entsprechend Abschnitt 3.2.1.4 durchgeführt. Es folgten 48 Stunden Proliferation und nach einem Waschschrift die Differenzierung der neuronalen Progenitorzellen für 72 Stunden; darauf erfolgte die Ernte (vgl. Abbildung 4-4). Die Transfektionseffizienz wurde mittels Auszählung je eines Gesichtsfeldes der lichtmikroskopischen und der korrespondierenden Aufnahme unter UV-Licht in drei unabhängigen Proben in zehnfacher Vergrößerung für jedes Vektorkonstrukt ermittelt. Fluoreszenz ließ sich nach 48h Proliferation (Zeitpunkt 2, vgl. Abbildung 4-4) bei pG-SHIN2 als Leervektor in 40±1,8% der Zellen nachweisen, bei JPG11 in 68±3,4%, bei JPG15 in 76±9,2% (vgl. Abbildung 4-5 – Abbildung 4-7). Der Transfektionserfolg war somit bei JPG11 gegenüber pG-SHIN2 statistisch signifikant höher, bei JPG15 gegenüber pG-SHIN2 ergab sich allerdings kein statistischer signifikanter Zusammenhang.

Ergebnisse

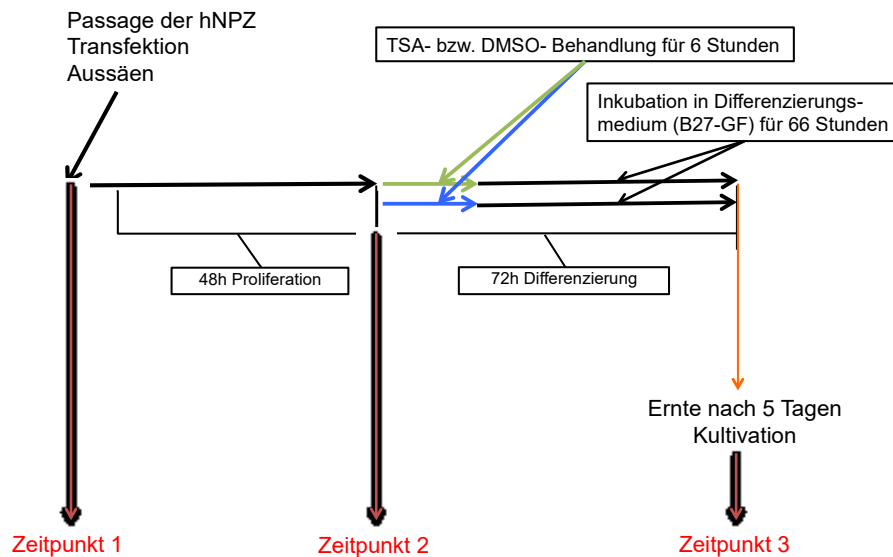


Abbildung 4-4: Kultivierungsschema für hNPZ

Für DMSO und TSA wurden Konzentrationen von je 1ng/ml verwendet (DMSO: 12,8nM, TSA: 3,3nM).

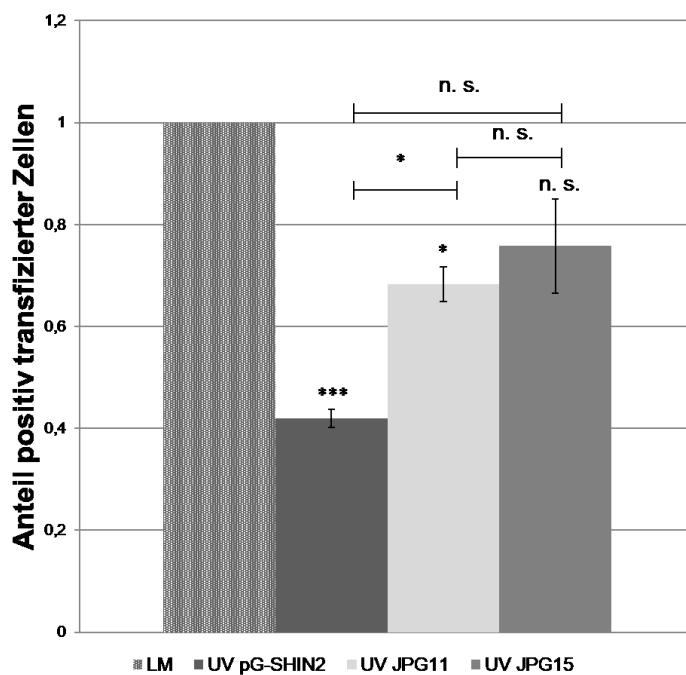


Abbildung 4-5: hNPZ lassen sich reproduzierbar mittels pG-SHIN2, JPG11 und JPG15 transfizieren

Transfektionseffizienz nach Konstrukt. Ermittlung mittels Auszählung je eines Gesichtsfeldes in zehnfacher Vergrößerung der lichtmikroskopischen und der korrespondierenden Aufnahme unter UV-Licht in drei unabhängigen Proben für jedes Vektorkonstrukt. Gegenüber der lichtmikroskopischen Aufnahme sind bei den Konstrukten pG-SHIN2 und JPG11 signifikant weniger Zellen in der Aufnahme unter UV-Licht zu erkennen. Das NPC1-Herunterregulationskonstrukt JPG11 weist eine signifikant höhere Transfektionseffizienz als der Leervektor pG-SHIN2 auf ($p \leq 0,05$, $p^{***} \leq 0,001$, n. s. = nicht signifikant).

LM, UV = lichtmikroskopische bzw. UV-beleuchtete Aufnahmen

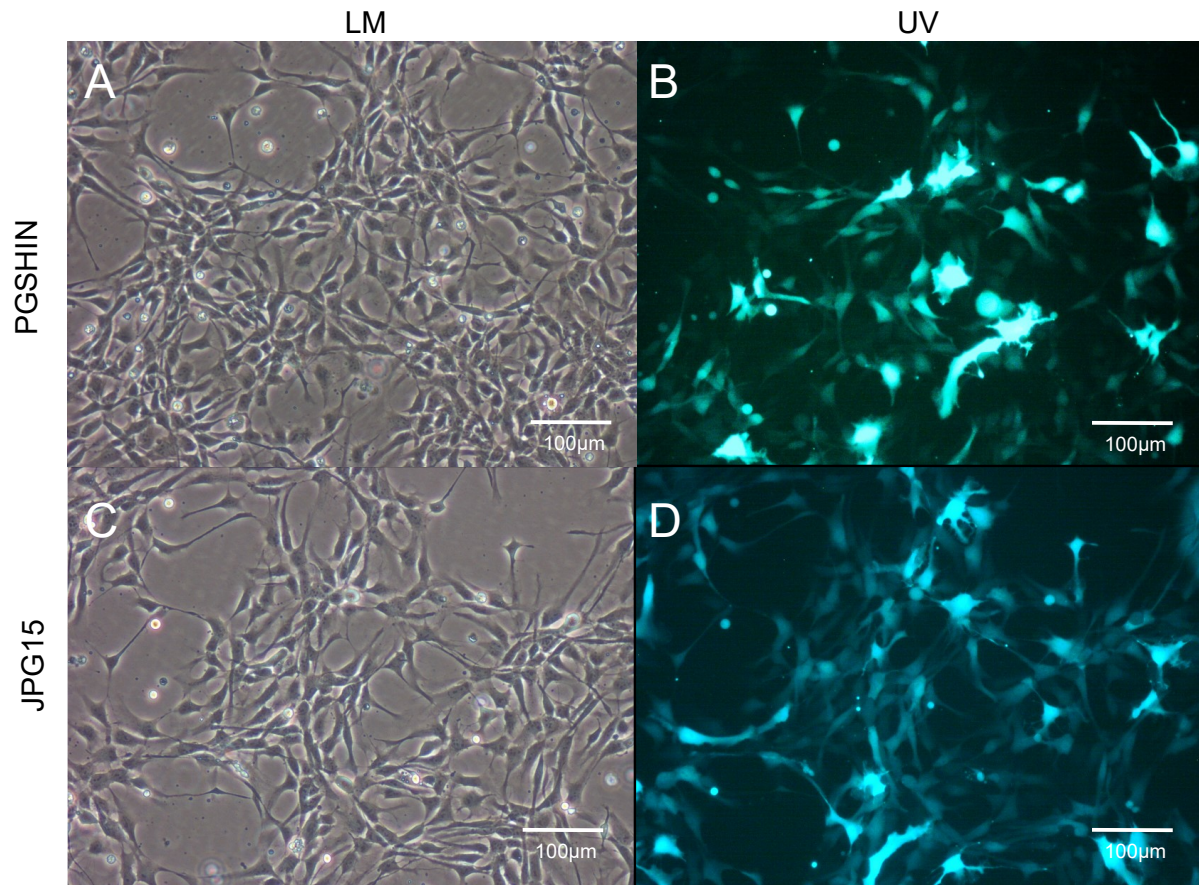


Abbildung 4-6: Beispielhafte mikroskopische Aufnahmen transfizierter, proliferierender hNPZ

Aufnahmen in zehnfacher Vergrößerung nach Transfektion mit JPG15 und 48 Stunden Proliferation (Medium B27+GF, Zeitpunkt 2, vgl. Abbildung 4-4). **A, C:** unter Lichtmikroskopie; **B, D:** unter Anregung durch UV-Licht und GFP-vermittelter grüner Fluoreszenz (Filtereinstellungen: EX: 510-560nm, DM: 575nm, BA: 590nm). **A, B:** Transfektion mit Leervektor pG-SHIN2, **C, D:** Transfektion mit NPC1-Herunterregulationskonstrukt JPG15. Die Belichtungszeit wurde durch die Automatik der Kamera festgelegt. In UV-Bildern wurde die Hintergrundfluoreszenz zur besseren Vergleichbarkeit mittels Bildbearbeitungssoftware angeglichen.

LM, UV = lichtmikroskopische bzw. UV-beleuchtete Aufnahmen; EX = Wellenlänge für Exzitationsfilter; DM = Wellenlänge für dichroitischen Spiegel; BA = Wellenlänge für Barrierefilter; pG-SHIN2 = Leervektor; JPG15 = NPC1-Herunterregulationskonstrukt

Zur Auswertung der NPC1-Herunterregulation wurden Western Blots mit anschließender Quantifizierung durchgeführt. Die Gewinnung der Gesamtzelllysate der transfizierten Zellen für den Western Blot erfolgte nach 48 Stunden Proliferation (Medium B27+GF), Mediumwechsel und Differenzierung für 72 Stunden (Medium B27-GF; Zeitpunkt 3 entsprechend Abbildung 4-4). Die Auswertung der NPC1-Proteinmenge durch Western Blot zeigt Abbildung 4-8. Es wurden die reifen Formen des Proteins zwischen circa 170-190kDa für die densitometrische Ermittlung der Proteinmenge genutzt. Es ist für beide Konstrukte eine klare Herunterregulation von

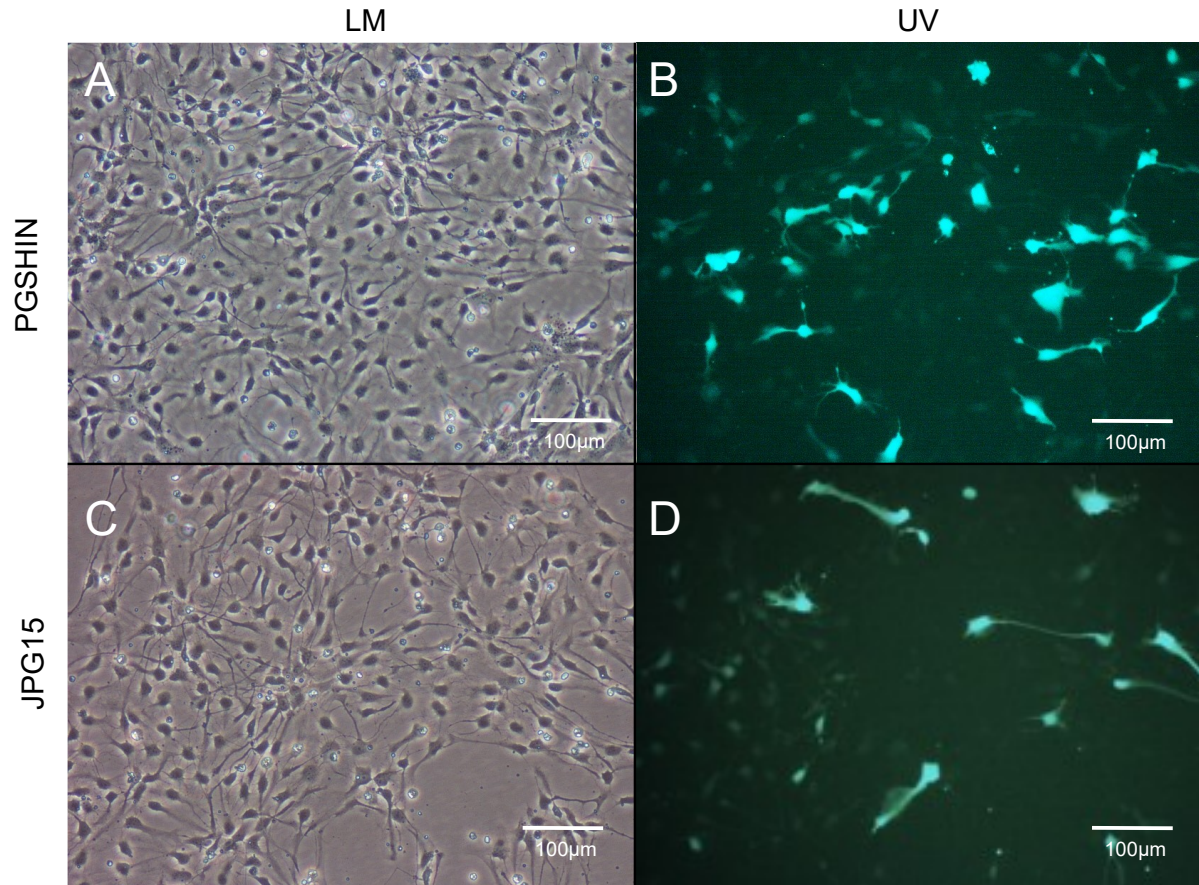


Abbildung 4-7: Beispielhafte mikroskopische Aufnahmen transfizierter, differenzierter hNPZ

Aufnahmen in zehnfacher Vergrößerung nach Transfektion mit JPG15, 48 Stunden Proliferation (Medium B27+GF) und 72 Stunden Differenzierung (Medium B27-GF, Zeitpunkt 3, vgl. Abbildung 4-4). **A, C:** unter Lichtmikroskopie; **B, D:** unter Anregung durch UV-Licht GFP-vermittelter grüner Fluoreszenz (Filtereinstellungen: EX: 510-560nm, DM: 575nm, BA: 590nm). **A, B:** Transfektion mit Leervektor pG-SHIN2, **C, D:** Transfektion mit NPC1-Herunterregulationskonstrukt JPG15. Die Belichtungszeit wurde durch die Automatik der Kamera festgelegt. In UV-Bildern wurde zur besseren Vergleichbarkeit die Hintergrundfluoreszenz mittels Bildbearbeitungssoftware angeglichen.

LM, UV = lichtmikroskopische bzw. UV-beleuchtete Aufnahmen; EX = Wellenlänge für Exzitationsfilter; DM = Wellenlänge für dichroitischen Spiegel; BA = Wellenlänge für Barrierefilter; pG-SHIN2 = Leervektor; JPG15 = NPC1-Herunterregulationskonstrukt

NPC1 ersichtlich (A). In der Quantifizierung der Banden (B) erreicht JPG11 eine signifikante NPC1-Herunterregulation auf $45\pm6\%$ des Ausgangsniveaus. Die Herunterregulation durch JPG15 ist ebenfalls signifikant ($55\pm8\%$). Im Western Blot stellt sich die Minderung der NPC1-Fraktion bei beiden Konstrukten in den bekannten Banden zwischen 140kDa und 200kDa gleichmäßig dar. Keines der verwendeten Konstrukte hat in der CASY-Zellzählung bei Ernte der Zellen einen Einfluss auf die Zahl der überlebenden Zellen/ml (C). Somit kann davon ausgegangen werden, dass weder die NPC1-Herunterregulation noch unspezifische Effekte der Plasmidkonstrukte

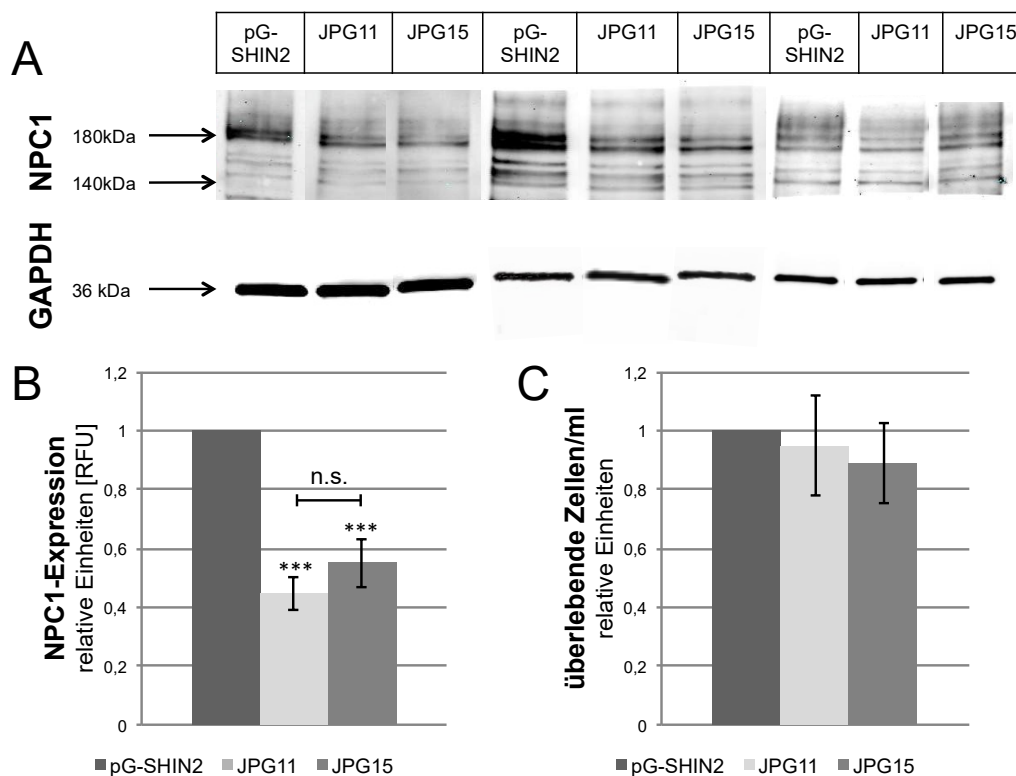


Abbildung 4-8: JPG11 und JPG15 bewirken deutliche und reproduzierbare NPC1-Herunterregulation

A: Beispielhafte Western Blot Analysen der NPC1-Herunterregulation in hNPZ-Gesamtzelllysaten (drei voneinander unabhängige Versuchsreihen dargestellt). Ernte erfolgte nach Transfektion, 48 Stunden Proliferation (Medium B27+GF), Mediumwechsel und Differenzierung für 72 Stunden (Medium B27-GF; Zeitpunkt 3 entsprechend Abbildung 4-4). Beide NPC1-Herunterregulationskonstrukte (JPG11, JPG15) führen zu deutlich erkennbarer Herunterregulation der NPC1-Banden. **B:** Quantifizierung der NPC1-spezifischen Western Blot Banden der reifen NPC1-Proteinfraktionen zwischen circa 170-190kDa. JPG11 führte signifikante Herunterregulation im Vergleich zu Kontrolle herbei, die Herunterregulation durch JPG15 ist ebenfalls signifikant ($n=10$, $p<0,001$). **C:** Prüfung des Zellüberlebens nach Konstrukt durch Zellzählung/ml transfizierter Zellen gegenüber Leervektor-Kontrolle nach Ernte der Zellen. Keines der beiden NPC1-Herunterregulationskonstrukte übt einen signifikanten Einfluss auf die Zahl überlebender Zellen aus ($n=10$).

pG-SHIN2 = Leervektor; JPG11 bzw. JPG15 = NPC1-shRNA-Konstrukte; RFU = *raw field units* wie per Infrarotscanner ermittelt; n. s. = nicht signifikant; $p^{***}\leq 0,001$. Zur besseren Vergleichbarkeit der Western Blot-Bilder wurden per Bildbearbeitungssoftware Intensitätsanpassungen vorgenommen.

Ursachen für verschlechtertes Zellüberleben darstellen könnten. Aufgrund der tendenziell stärkeren NPC1-Herunterregulation durch JPG11 wurde dieses Konstrukt in den weiteren Experimenten verwendet.

4.3 TSA-Effekt auf hNPZ nach NPC1-Herunterregulation

Nach der Herstellung eines robusten und reproduzierbaren NPC1-Phänotyp in hNPZ sollte in diesen NPC1^{kd}-Zellen nun die Wirksamkeit von TSA untersucht werden. Bei neurodegenerativen Erkrankungen liegen vielfältige Befunde zu epigenetischen Dysregulationen vor (Gräff *et al.*, 2011) und HDACi bieten vielversprechende Therapieansätze (Coppedè, 2014). Im Speziellen in NP-C-Fibroblasten konnte ein Einfluss von HDACi auf den NP-C-Krankheitsphänotyp demonstriert werden (Pipalia *et al.*, 2011). Bisher liegen zur Wirkung von HDACi auf NP-C in menschlichen neuronalen Zellen keine Befunde vor.

Hinsichtlich der Inkubationsdauer und Konzentration von TSA mussten für das hNPZ-Zellkulturmodell gegenüber dem Schema für Fibroblasten (72 Stunden Inkubation, 370nM TSA, vgl. Abbildung 4-1) Anpassungen vorgenommen werden, da die hNPZ-Zelllinie (ReNCell-VM) gänzlich verschiedene Charakteristika aufweist (u. a. deutlich kürzere Verdopplungszeit, höhere toxische Suszeptibilität; vgl. Donato *et al.*, 2007).

TSA wurde als Modulator von Zellproliferation und Apoptose für onkologische Indikationen geprüft (You und Park, 2013) und es wurde eine spezielle Wirksamkeit auf schnell proliferierende Krebszellen beschrieben (Papeleu *et al.*, 2005). VM-Zellen als schnell proliferierende immortalisierte Zellen erfordern dementsprechend eine Dosisanpassung im Vergleich zu Fibroblasten, bei denen eine Dosis von 370nM (112 ng/ml) verwendet wurde. Yoshida *et al.* beschrieben in murinen Brustdrüsenzellen ein deutlich eingeschränktes Zellüberleben bei 10ng/ml. Bereits 2ng/ml konnten eine deutliche Steigerung der Histonacetylierung bewirken (Yoshida *et al.*, 1990), die ein wichtiges Target für die TSA-Wirkung ist (s. o.). Gaub *et al.* beschrieben an primären murinen neuronalen Zellen des *nervus opticus* die Dosis von 1ng/ml TSA als wirksam (Gaub *et al.*, 2011).

In eigenen Experimenten konnte an proliferierenden und an differenzierten hNPZ bei 1ng/ml gegenüber 10ng/ml ein Vorteil hinsichtlich des Zellüberlebens und der Proteinmenge festgestellt werden (s. Abbildung 4-9, A, B bzw. C, D). Dies stellte sich ebenfalls nach Transfektion entsprechend dar (s. Abbildung 4-10). Der Proteingehalt war ebenfalls tendenziell gesteigert bei einer TSA-Dosis von 1ng/ml (s. Abbildung 4-9 B, D); auch nach der Transfektion zeigte sich dieser Trend (s. Abbildung 4-10 B). 1ng/ml TSA wurde entsprechend als gut tolerierte Dosierung in den folgenden Experimenten verwendet.

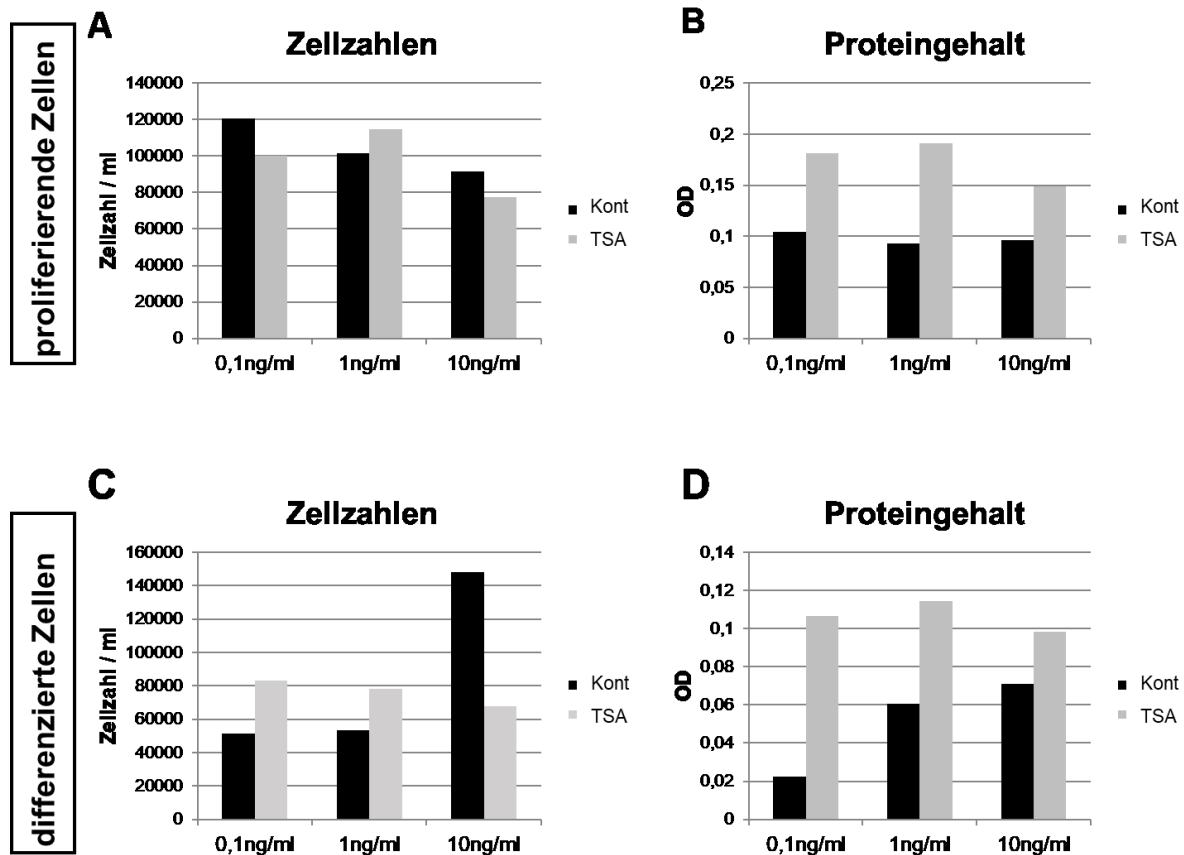


Abbildung 4-9: Zellzahlen und Proteingehalt bei hNPZ und unterschiedlichen Konzentrationen von DMSO (Kont) und TSA im Vergleich. **A:** Proliferierende hNPZ, Zellernte nach 48 Stunden Proliferation (Medium B27+GF, Zeitpunkt 2, vgl. Abbildung 4-4). Leicht erhöhte Zellzahlen bei 1ng/ml TSA, Reduktion der Zellzahlen bei 10ng/ml. **B:** Proteingehalt in TSA-Proben bei allen Dosierungen gesteigert. **C:** Zellernte nach 48h Proliferation und 72h Differenzierung (Zeitpunkt 3, vgl. Abbildung 4-4). Erhöhte Zellzahlen bei 1ng/ml TSA, deutliche Reduktion der Zellzahlen bei 10ng/ml TSA, jedoch möglicher Messfehler bei 10ng/ml-Kontroll-Probe (deutlicher Ausreißer). **D:** Proteingehalt in allen TSA-behandelten Proben erhöht.

Kont = Kontrolle (DMSO); TSA = Trichostatin A; OD = *optical density*, optische Dichte

Nach Transfektion und 48-stündiger Proliferationsphase wurden TSA bzw. DMSO in Konzentrationen von 1ng/ml (TSA: 3,3nM, DMSO: 12,8nM) in Differenzierungsmedium gelöst für sechs Stunden zugegeben. Nach Waschen mit HBSS erfolgte die Inkubation in Differenzierungsmedium ohne DMSO/TSA-Zusatz für die verbleibenden 66 Stunden (vgl. Abbildung 4-4).

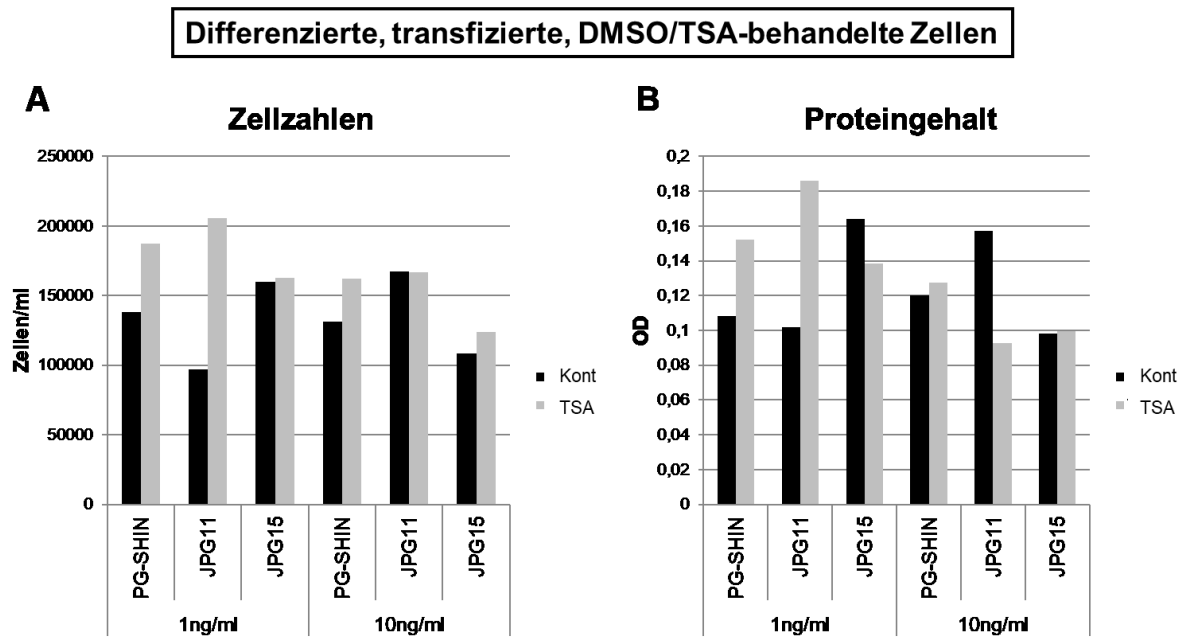


Abbildung 4-10: Zellzahlen (A) und Proteingehalt (B) bei hNPZ nach Transfektion (PG-SHIN; JPG11, JPG15) und Anwendung von 1 bzw. 10ng/ml DMSO (= Kont) versus TSA. Differenzierte hNPZ nach Transfektion mit Leervektor (PG-SHIN) oder NPC1-*knockdown*-Konstrukten (JPG11 bzw. JPG15), 48 Stunden Proliferation (Medium B27+GF) und 72 Stunden Differenzierung (Medium B27-GF) mit oder ohne TSA (Dosis 1 bzw. 10ng/ml; Zeitpunkt 3, vgl. Abbildung 4-4). Transfektion mit Leervektor (PG-SHIN) oder NPC1-*knockdown*-Konstrukten (JPG11 bzw. JPG15). **A:** Zellzahlen sind unter 1ng/ml gesteigert bei Leervektor und JPG11; **B:** Proteinmenge unter 1ng/ml bei Leervektor und JPG11 gesteigert.

Kont = Kontrolle (DMSO); TSA = Trichostatin A; OD = *optical density*, optische Dichte; PG-SHIN = Leervektor; JPG11, JPG15 = NPC1-*knockdown*-Konstrukte

Im Western Blot (s. Abbildung 4-11 A, B) konnte eine Steigerung der NPC1-Bande von $47 \pm 3,3\%$ nach NPC1^{kd}-Transfektion auf $73 \pm 11\%$ nach TSA-Anwendung im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden. Die TSA-Behandlung konnte eine statistisch signifikante Steigerung des zellulären NPC1-Gehalts bewirken, ohne dabei die Zellsterblichkeit zu erhöhen (s. Abbildung 4-11 C). Hinsichtlich des Musters der Bandenaugmentation lässt sich grundlegend eine Verstärkung aller Reifungsformen des Proteins zwischen 140kDa und circa 200kDa feststellen; es fällt jedoch eine präferentielle Verdichtung der oberen der zwei Hauptbanden bei 180kDa auf, welche – ähnlich wie in den Fibroblastenproben (vgl. Abbildung 4-3) – auf die Steigerung der Menge der höhergewichtigen NPC1-Proteinspezies in TSA-behandelten Proben hinweisen kann.

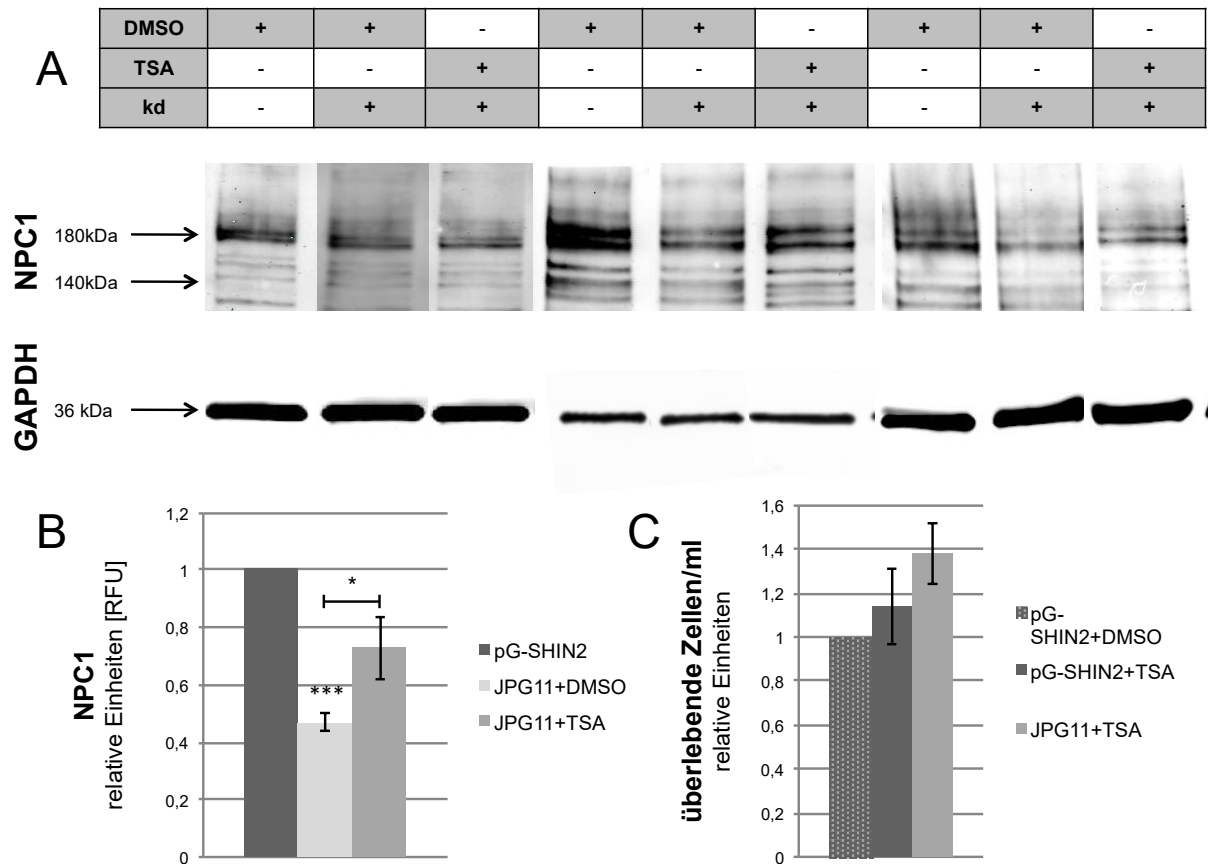


Abbildung 4-11: TSA verstärkt NPC1-Bande in NPC1^{kd}-hNPZ signifikant

A: Beispielhafte Western Blot Analysen NPC1^{kd}-shRNA-transfizierter und TSA-behandelter hNPZ-Gesamtzelllysate (n=3). Es erfolgten nach Passage der Zellen Transfektion, 48 Stunden Proliferation (Medium B27+GF), Mediumwechsel und Differenzierung für 72h (Medium B27-GF; Zeitpunkt 3 entsprechend Abbildung 4-4). Anschließend erfolgte die Ernte, Herstellung der Gesamtzelllysate und Western Blot sowie dessen Quantifizierung. TSA führt eine deutlich sichtbare Verstärkung der NPC1-Banden herbei. **B:** Quantifizierung der NPC1-spezifischen Western Blot Banden der reifen NPC1-Proteinfraktionen zwischen circa 170-190kDa. Es ist eine signifikante Herunterregulation der NPC1-Expression festzustellen (JPG11+DMSO, n=5, p≤0,001); TSA kann die NPC1-Bande signifikant vers (JPG11+TSA, n=5, p≤0,05). **C:** TSA übt gemessen an der jeweiligen DMSO-behandelten Kontrolle bei einer Konzentration von 1ng/ml (3,3nM) keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl/ml aus (n=3).

kd = *knockdown*, i. e. Transfektion Leervektor pG-SHIN2 (-) bzw. mit NPC1-Herunterregulationskonstrukt JPG11 (+); TSA, DMSO = Behandlung mit TSA bzw. DMSO für 6 Stunden bei 1ng/ml (vgl. hierzu Abbildung 4-4); RFU = *raw field units* wie per Infrarots Scanner ermittelt; Kont = Kontrolle; p*≤0,05, p***≤0,001. Zur besseren Vergleichbarkeit der Western Blot-Bilder wurden per Bildbearbeitungssoftware Intensitätsanpassungen vorgenommen.

5 Diskussion

Morbus Nieman-Pick Typ C1 (NP-C) ist eine seltene Krankheit, deren Erforschung bislang zumeist in nicht-humanen und nicht-neuronalen Krankheitsmodellen erfolgt. Die Übertragbarkeit von Befunden auf die humane Pathophysiologie ist daher oft stark eingeschränkt. Humane neuronale NP-C Krankheitsmodelle sind von großem Interesse und bisher nur in Ansätzen erforscht (vgl. Abschnitt 1.2); die Erstellung eines solchen Modells stellte das Ziel dieser Arbeit dar. Hierzu wurden shRNA-transfizierte ReNCell VM-Zellen verwendet, welche als eine gut verfügbare und exakt beschriebene Linie humaner neuronaler Progenitorzellen (hNPZ) eine hervorragende Grundlage für die Erforschung humaner neuronaler Pathophysiologie darstellt (vgl. Abschnitt 3.2.1.2.; Donato *et al.*, 2007; Hübner *et al.*, 2010; Jaeger *et al.*, 2015; Schmöle *et al.*, 2010).

Zur funktionellen Testung des Zellmodells wurde in einem zweiten Schritt die Wirkung des Histondeacetylaseinhibitors (HDACi) Trichostatin A (TSA) erprobt. Die Therapie von NP-C beschränkt sich bisher weitgehend auf symptomatische Maßnahmen (NP-C Guidelines Working Group *et al.*, 2009; Patterson *et al.*, 2012; Vanier, 2010) und HDACi stellen vielversprechende Wirkstoffe dar (Gelsthorpe *et al.*, 2008; Helquist *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2013; Pipalia *et al.*, 2011; Wehrmann *et al.*, 2012). Die Wirkung von TSA wurde zunächst in Fibroblasten nachvollzogen, da hier bereits eine NPC1-spezifische Wirksamkeit beschrieben wurde (Pipalia *et al.*, 2011, 2017). In einem zweiten Schritt erfolgte die Testung am hNPZ-Modell.

5.1 Etablierung eines zentralnervösen humanen NP-C Modells

Die Erforschung der zellulären NP-C Pathophysiologie basierte in der Vergangenheit hauptsächlich auf nicht-zentralnervösen oder nicht-humanen Modellen. Es wurden vielfach Fibroblasten verwendet (Carstea *et al.*, 1997; Millat *et al.*, 1999; Pipalia *et al.*, 2011), jedoch ist in der humanen Pathophysiologie die zentralnervöse Komponente von NP-C prognoseentscheidend (Vanier, 2010). Zudem unterscheidet sich die zentralnervöse Pathologie stark von der peripherer Zellen (vgl. Abschnitt 1.2.3). In Kürze seien hier insbesondere Unterschiede in der Lipidakkumulation genannt: In peripheren Zellen akkumulieren exogene, unveresterte Cholesterole, in zentralnervösen Zellen Ganglioside (GM2, GM3) aus zelleigener Produktion (Karten *et al.*, 2009; Trilck *et al.*, 2017; Vanier, 1999); zudem finden sich pathomorphologische Unterschiede, die auf zellspezifische pathophysiologische Charakteristika schließen

lassen (German *et al.*, 2002; Love *et al.*, 1995; Walkley und Suzuki, 2004). Zur Untersuchung eines zentralnervösen NP-C-Phänotyps werden vielfach murine Krankheitsmodelle verwendet. Die humane Pathophysiologie unterscheidet sich jedoch wiederum in vielen Punkten von der murinen (vgl. Abschnitt 1.2.2).

In der Erforschung von NP-C sind humane zentralnervöse Modelle entsprechend von großem Interesse. Die in dieser Arbeit verwendeten ReNCell VM-Zellen sind immortalisierte pluripotente Stammzellen des ventralen Mesencephalons eines zehn Wochen alten humanen Fötus (vgl. Abschnitte 1.2.3, 3.2.1.2). Sie eignen sich aufgrund verschiedener Charakteristika hervorragend für die vorliegende Fragestellung. Sie weisen in der Proliferationsphase eine schnelle Verdopplungszeit (circa 24 Stunden) auf (Hoffrogge *et al.*, 2006), sodass sie eine schnell in großer Zahl verfügbare Zelllinie darstellen. Der Eingriff in die Zellphysiologie durch die Immortalisierung mit dem *v-myc*-Onkogen stellt einerseits eine Entfernung von der physiologischen Situation dar, ermöglicht jedoch auch eine Geno- und Phänotypstabilität über längere Kultivationsdauern und Passagen der Zellen (Hoffrogge *et al.*, 2006). Für die Kultivation der Zellen kann auf ein standardisiertes Zellkulturprotokoll zurückgegriffen werden. Das Potential der Zellen, zu differenzieren, erweitert die Möglichkeiten dieser Zellen; dies ist besonders von Interesse, da für NPC1^{-/-} Neuronen eine verringerte Differenzierungsfähigkeit nachgewiesen werden konnte (Yang *et al.*, 2006). Unter den reifen Gliazellen kommen hauptsächlich Astrozyten vor, unter den reifen Neuronen finden sich zu 10% dopaminerge Neuronen (Hoffrogge *et al.*, 2006), welche zudem elektrophysiologisch aktiv sind (Donato *et al.*, 2007). Die Zelllinie gilt als sehr gut charakterisiert und konnte viele Einblicke in das Proteom, Signalwege und elektrophysiologische Charakteristika von hNPZ liefern (Hoffrogge *et al.*, 2006; Hübner *et al.*, 2010; Jaeger *et al.*, 2015; Lange *et al.*, 2011; Mazemondet *et al.*, 2011; Schmöle *et al.*, 2010). Die in ReNCell-VM-Zellen verlässlich durchführbare shRNA-Nukleofektion eröffnet desweiteren Möglichkeiten zur Untersuchung spezifischer Zielproteine. Ansätze shRNA-vermittelter Herunterregulation von Zielproteinen stellen eine etablierte und schnell durchführbare Möglichkeit dar, einen Krankheitsphänotyp zu modellieren.

Es existieren zwei Arbeiten zu shRNA-basierten NPC1-Modellen. Ordonez *et al.* widmeten sich der Rolle der Autophagie und dem medikamentösen Effekt eines Autophagie-Blockers sowie des Therapeutikums Cyclodextrin in einem Zellmodell transfizierter humaner embryonaler Stammzellen (Ordonez *et al.*, 2012); Rodríguez-

Pascau *et al.* dokumentierten die Erstellung der stabilen NPC1^{mt}-Zelllinie durch Transfektion aus humanen Neuroblastom-Zellen und den biochemischen Phänotyp durch Filipin-Färbung und Feststellung von Gangliosid-Akkumulation (GM2, 3; Rodríguez-Pascau *et al.*, 2012).

In vorliegender Arbeit wurden zwei verschiedene Oligonukleotidsequenzen getestet, welche jeweils in den Vektor pG-SHIN2 integriert wurden. Die Sequenz JPG11 beruht auf eigenen Daten (mündliche Kommunikation mit Dr. J. Luo). Die Sequenz für das Konstrukt JPG15 wurde in einem *high-throughput-screening* verschiedener Sequenzen beschrieben (Arora *et al.*, 2010). In dieser Studie wurde ein Vergleich verschiedener Oligonukleotidsequenzen durchgeführt, bei welchem die Cholesterolakkkumulation (gemessen anhand der Filipin-Reaktivität) durch JPG15 in drei verschiedenen Fibroblastenzelllinien am deutlichsten ausgelöst werden konnte (Arora *et al.*, 2010).

Zur Bestimmung der NPC1-Herunterregulation wurden Western Blots durchgeführt. Das Konstrukt JPG11 konnte nach Transfektion in hNPZ gegenüber dem Konstrukt JPG15 ein besseres Ergebnis erzielen ($45\pm 6\%$ versus $55\pm 8\%$ NPC1-Restexpression, $p < 0,001$, vgl. Abschnitt 4.2, Abbildung 4-8). In vergleichbaren Publikationen wurden mittels shRNA-Transfektion ähnliche Ergebnisse beobachtet (Ordonez *et al.*, 2012; Rodríguez-Pascau *et al.*, 2012). Eine gewisse Restexpression von NPC1 bildet zudem den in der menschlichen Erkrankung meist anzutreffenden eher langsamen klinischen Verlauf der Erkrankung besser ab als der *knock-out* wie im häufig verwendeten NPC1-BALB/c-Mausmodell. Bei NP-C liegen zumeist *missense*-Mutationen im NPC1-Gen vor (Park *et al.*, 2003), deren häufigste (I1061T) als fehlgefaltetes Protein ebenfalls Restaktivität aufweist (Gelsthorpe *et al.*, 2008). Zusammenfassend ist von einer pathophysiologisch bedeutsamen Verminderung der NPC1-Proteinmenge auszugehen, die eine NP-C-typische Lipidakkumulation bewirken sollte, welche in weiterführenden Untersuchungen zu belegen wäre. Als wesentliche Unterschiede zwischen shRNA-induzierter und *in-vivo* Pathophysiologie bei NP-C wären folgende zu nennen: Der shRNA-Transfektion liegt eine Inhibition der physiologischen Expression von NPC1-mRNA zugrunde anstatt eines Gendefekts. Hierdurch ergibt sich ein Gegensatz zur NP-C-Pathophysiologie insofern, als in NP-C Patienten-Fibroblasten normale bis erhöhte NPC1-mRNA-Level demonstriert werden konnten und weniger korrekt gefaltetes NPC1-Protein vorliegt (Gelsthorpe *et al.*, 2008). Im Falle der shRNA-basierten Herunterregulation ist allerdings von erniedrigten NPC1-mRNA-

Leveln auszugehen. Außerdem entstehen durch die meisten Punktmutationen im NPC1-Gen Fehlfaltungen im korrespondierenden Protein durch den Austausch einzelner Aminosäuren (Gelsthorpe *et al.*, 2008); durch shRNA-vermittelte NPC1-Herunterregulation entsteht hingegen eine Verminderung der Proteinmenge, welche die dokumentierten qualitativen Veränderungen des NPC1-Proteins, z. B. hinsichtlich eines Proteinfaltungsdefekts (Gelsthorpe *et al.*, 2008), nicht nachbilden kann. Mutationsspezifische Untersuchungen der Folgen von Faltungsdefekten wurden bereits in murinen Modellen beschrieben, die z. B. die häufige I1061T-Mutation des NPC1-Gens konstitutiv ausbilden (Praggastis *et al.*, 2015). Die entscheidende pathophysiologische Endstrecke in Form der Lipidakkumulation durch funktionalen NPC1-Mangel ist in diesem Modell jedoch, z. B. durch Filipin-Testung, untersuchbar.

5.2 NPC1-Induktion durch HDACi bei NPC1^{mt}-Fibroblasten

Die Erprobung von therapeutischen Wirkstoffen stellt ein wichtiges Anwendungsgebiet von Krankheitsmodellen dar. Bisherige therapeutische Ansätze bei NP-C beschränken sich weitgehend auf symptomatische Behandlung und es besteht dringender Bedarf an neuen Wirkstoffen (vgl. Abschnitt 1.3, NP-C Guidelines Working Group *et al.*, 2009; Patterson *et al.*, 2012). HDACi stellen eine vielversprechende Wirkstoffklasse dar und konnten bereits in verschiedenen Maus- und Fibroblasten-basierten Studien Ihre Wirksamkeit in der Beeinflussung des zellulären NP-C Phänotyps zeigen. Munkacsi und Kollegen konnten in NPC1^{mt}-Fibroblasten mit verschiedenen NPC1-Mutationen durch HDACi-Inkubation (SAHA, TSA) eine Reduktion der Cholesterollakkumulation im Filipin-Test demonstrieren. Als Mechanismus der Reduktion wurde die Beeinflussung von HDAC-Genen postuliert: in NPC1^{mt} konnte deren Dysregulation mittels quantitativer *real-time* PCR demonstriert werden. Die Anwendung von HDACi konnte den physiologischen Zustand der HDAC wiederherstellen und ging mit der Verminderung der Lipidakkumulation einher (Munkacsi *et al.*, 2011). Die Beeinflussung des NP-C-Phänotyps durch den HDACi Valproat untersuchten Kim *et al.* in primären neuronalen Zellkulturen von NPC1-defizienten BALB/c-Mäusen. Valproat konnte eine verbesserte neuronale Differenzierung und verringerte Cholesterolspeicherung bewirken (Kim *et al.*, 2007). Da dieser Befund bei NPC1-defizienten Mäusen erhoben wurde, lässt sich auf NPC1-Genotyp-unabhängige Wirkungen von HDACi schließen. Zur spezifischen Wirkung von HDACi auf die zelluläre NPC1-Protein-Verfügbarkeit konnten Pipalia *et al.* Belege erbringen. Sie führten bei verschiedenen NPC1^{mt}-Fibroblasten-Linien

Experimente mit den HDACi CI-994, SAHA, LBH589 und TSA durch. Sie konnten nach HDACi-Behandlung an verschiedenen NPC^{mt}-Zelllinien im Western-Blot vermehrt NPC1-Protein und verminderte Cholesterolakкумуляtion in den Zellen nachweisen (Pipalia *et al.*, 2011); zudem konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit des NPC1-Proteins durch HDACi gesteigert wurde (Pipalia *et al.*, 2017).

Da bereits in Fibroblasten-gestützten Studien Nachweise zur Wirksamkeit von TSA erbracht werden konnten, sollte dies zunächst an eigenen Fibroblastenkulturen nachvollzogen werden, um in einem zweiten Schritt das neu etablierte hNPZ-NPC1-Modell entsprechend mit TSA zu testen. Bei den verwendeten Fibroblasten-Zelllinien liegen unterschiedliche Mutationen vor (vgl. Abschnitt 3.2.1.1). Eine der verwendeten Zelllinien wurde als TSA-responsiv beschrieben (GM03123; Pipalia *et al.*, 2011), für die andere liegen bisher keine experimentellen Daten dazu vor (GM18436). Die NPC^{mt}-Zelllinien GM03123 und GM18436 weisen im Western-Blot eine deutliche Abschwächung der NPC1-Banden auf (s. Abbildung 4-3), welche als Folge der NPC1-Mutationen auftreten. Der HDACi TSA konnte in beiden Zelllinien Einfluss auf die NPC1-Bande im Western Blot ausüben (vgl. Abschnitt 4.1). Insbesondere eine Fraktion der NPC1-Banden wies eine Verstärkung im Western-Blot auf (s. Abbildung 4-3). Diese höhermolekulare Fraktion liegt bei etwa 200 bis 210kDa und stellt sich, wenn auch in der Wildtyp-Probe etwas schwächer, in allen TSA-behandelten Proben dar. Dies steht in Übereinstimmung mit bisherigen Befunden zur Beeinflussung des NPC1-Proteins in Western-Blot-Proben (Pipalia *et al.*, 2011, 2017). Für das NPC1-Protein sind mehrere, verschieden funktionale Proteinfractionen zwischen 140 und 210kDa beschrieben worden (Watari *et al.*, 1999a, 1999b); das Auftreten des NPC1-Effekts in der höhermolekularen Proteinfraction ordnen wir einer glykosylierten, unreifen, und deswegen höhermolekularen NPC1-Proteinfraction zu, die durch die TSA-Anwendung verstärkt wurde. Dies kann im Rahmen der Minderung von Faltungsdefekten auftreten. Beispielsweise durch Anwendung chemischer Chaperone können unreife, höhermolekulare NPC1-Proteinformen mit geringerer Halbwertszeit bei zugrundeliegenden Faltungsdefekten entstehen, welche auch für NP-C postuliert werden (Gelsthorpe *et al.*, 2008; Pipalia *et al.*, 2017). Da für HDACi die Beeinflussung von Chaperonen beschrieben ist (Baumeister *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2011b; Yang *et al.*, 2013), gehen wir von einer Vermittlung dieser höhermolekularen NPC1-Proteinspezies durch TSA aus.

Zur funktionalen Testung der geschilderten Effekte kann ein Filipin-Test Aufschluss über den Einfluß von TSA auf die Lipidspeicherung im Rahmen von NP-C erbringen. In den beschriebenen Publikationen erbrachte diese in TSA-behandelten NPC1^{mt}-Fibroblasten eine verringerte bis aufgehobene lysosomale Speicherung nicht-veresterter Cholesterole (Munkacsı *et al.*, 2011; Pipalia *et al.*, 2011, 2017). Insbesondere zur physiologischen Relevanz der verstärkten NPC1-Fraktion bei circa 200 kDa können so Hinweise erbracht werden. Eine experimentelle Überprüfung des Glykosylierungsstatus des NPC1-Proteins ist ebenfalls von Interesse. Wie in anderen Arbeiten zu NP-C beschrieben (Gelsthorpe *et al.*, 2008), ließe sich per Endoglykosidase-H (Endo-H)-Verdau differenzieren, ob die durch TSA-Anwendung verstärkte Bande bei circa 200 bis 210kDa die unreife Form des Proteins im endoplasmatischen Retikulum (ER) darstellt oder eine stabilisierte, Endoglykosidase-resistente Proteinfraktion. Ebenso ließe sich über Lokalisationsanalysen mittels immunhistochemischer Färbungen weiterer Aufschluss über die Lokalisation des Proteins erlangen; Färbung mit einem ER-Marker Protein sowie einem lysosomalen Marker könnte den Anteil, der im ER verbleibt, visualisieren und den Mangel normaler Reifung des Proteins in Richtung des LE/L nachweisen (Zampieri *et al.*, 2011)

5.3 TSA-Wirkung bei hNPZ nach shRNA-Transfektion

Nach der vorläufigen Etablierung wurde zur funktionellen Testung des hNPZ-Modells der HDACi TSA angewendet. Im Besonderen war es ein Ziel, zu testen, ob die durch Western Blot ermittelten erniedrigten NPC1-Proteinlevel in NPC1^{kd}-hNPZ durch TSA in Richtung des physiologischen Zustands zu beeinflussen sind.

Wie in der Literatur beschrieben (Gaub *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 1990) und in eigenen Experimenten demonstriert (vgl. Abschnitt 4.3, Abbildungen 4-9, 4-10) erwies sich eine TSA-Konzentration von 1ng/ml bei sechsständiger Inkubation für die neuronalen Zellen als günstig. Es konnte eine in voneinander unabhängigen Experimenten reproduzierbare und statistisch signifikante Steigerung der NPC1-Bande im Western Blot von $47 \pm 3,3\%$ nach NPC1-shRNA-Transfektion auf $73 \pm 11\%$ des NPC1-Ausgangswerts nach TSA-Inkubation erreicht werden (s. Abschnitt 4.3, Abbildung 4-11). In der Fibroblasten-basierten Publikation von Pipalia *et al.* (2011) wurde keine quantitative Analyse der NPC1-Expressionssteigerung durch HDACi vorgenommen, die dargestellte Verstärkung der NPC1-Bande lässt jedoch eine ähnliche Zunahme der NPC1-Menge vermuten (Pipalia *et al.*, 2011).

Hinsichtlich des Mechanismus der Steigerung der NPC1-Expression durch TSA im Western-Blot verfolgen wir zwei Hypothesen (s. Abschnitt 1.3.2): Erstens findet eine indirekte Stimulation des NPC1-Promotors durch TSA statt. Via dbcAMP konnte eine Induktion des NPC1-Promotors nachgewiesen werden, welche CREB (*cAMP response element binding protein*)-vermittelt ist; CREB wiederum stellt ein Zielprotein von TSA dar, sodass über diesen Mechanismus von einer Induktion der NPC1-Expression durch TSA auszugehen ist (Gévry *et al.*, 2003). Zweitens vermittelt TSA eine erhöhte Verfügbarkeit funktionellen NPC1-Proteins durch Induktion molekularer Chaperone, welche einem Proteinfaltungsdefekt entgegenwirken können (Gelsthorpe *et al.*, 2008; Nakasone *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2013), wiewohl nicht von Einfüssen durch Faltungsdefekte im vorliegenden Modell auszugehen ist, da die shRNA auf mRNA-Ebene eingreift.

Der beschriebene experimentelle Aufbau konnte nach TSA-Inkubation eine reproduzierbare Steigerung der Menge des NPC1-Proteins im Western Blot aufzeigen. Die Klärung der Mechanismen der Steigerung der Proteinmenge kann Grundlage für weitere Experimente sein. Zur Differenzierung zwischen gesteigerter Promotoraktivität, verminderten Proteinfaltungsdefekts oder erhöhter Chaperon-Expression wären einerseits *real time PCR*-Untersuchungen, andererseits Western Blots von Interesse. Eine direkte Interferenz von shRNA und TSA erscheint insofern unwahrscheinlich, als dass sie unterschiedliche Angriffspunkte aufweisen: Es wird angenommen, dass TSA einerseits auf die transkriptionale Aktivierung durch Auflockerung der Chromatinstruktur und andererseits auf die Transkription von Chaperonen wirkt; shRNA wirkt hingegen auf den Transkriptionsprozess. Somit konnte der von Pipalia *et al.* in Fibroblasten beschriebene Effekt von TSA erstmals in humanen neuronalen Zellen gezeigt werden.

6 Zusammenfassung

Die Etablierung eines auf humanen neuronalen Progenitorzellen (hNPZ) basierenden Zellkulturmodells mittels shRNA-Transfektion (NPC1^{kd}-hNPZ) und der Nachweis einer NPC1-restitutiven Wirkung des Histondeacetylaseinhibitors (HDACi) Trichostatin A (TSA) stellten die Ziele dieser Arbeit dar. Hierzu wurden zum einen Fibroblasten von Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NP-C)-Patienten verwendet und in einem zweiten Schritt ein NP-C-Krankheitsmodell in hNPZ durch transiente shRNA-Transfektion generiert.

In NPC1^{mt}-Fibroblasten zweier unterschiedlicher Zelllinien konnte eine Zunahme der NPC1-Bande im Western Blot beobachtet werden. Es zeigte sich keine homogene Verstärkung der NPC1-Bande bei 170-190kDa, stattdessen ließ sich die Verstärkung einer distinkten NPC1-Bande bei circa 200 bis 210kDa in zwei unterschiedlichen NPC1^{mt}-Zelllinien beobachten. Wiewohl diese höhermolekulare Bande in der Literatur beschrieben wurde, sollten hierzu weitere Experimente zur pathophysiologischen Einordnung erfolgen.

Die Generierung eines NP-C-Krankheitsmodells in hNPZ gelang mittels shRNA-Transfektion. Es wurden zwei verschiedenen Oligonukleotidsequenzen getestet. Beide konnten eine reproduzierbare und signifikante NPC1-Herunterregulation bewirken. Diese war auch nach mehreren Tagen Zellkultur auf einem Niveau, welches der NPC1-Restaktivität bei menschlichen NPC1^{mt}-Zellen entspricht. Es gelang damit die Generierung eines humanen neuronalen NP-C Zellmodells, welches aufgrund seiner methodisch relativ geringen Aufwändigkeit eine gute Alternative zu etablierten Modellen darstellt. Es folgten Experimente, um die Wirkung des HDACi TSA auf das zuvor generierte NPC1^{kd}-hNPZ Modell zu testen. TSA konnte eine reproduzierbare Steigerung der Intensität der NPC1-Bande im Western Blot im Vergleich zu den unbehandelten NPC1^{kd}-Zellen bewirken. Dies liefert erstmalig einen Hinweis auf die Wirksamkeit von TSA auf die NPC1-Verfügbarkeit in einem humanen neuronalen Zellmodell von NP-C. Dies kann als Ausgangspunkt für die weitere Erforschung dieser Wirkstoffklasse bei NP-C dienen.

Nachfolgende Untersuchungen können insbesondere die biochemische Charakterisierung (Flipintest, Untersuchung der Akkumulation von GM2/3), Untersuchung epigenetischer Effekte (Histonacetylierung) sowie die Untersuchung von Einflüssen verminderten NPC1-Proteins auf die Morphogenese der hNPZ zum Ziel haben.

7 Thesen

1. Die lysosomale Speichererkrankung Niemann-Pick Typ C (NP-C) ist eine seltene neurodegenerative Erkrankung, für die das Spektrum verfügbarer Krankheitsmodelle und medikamentöser Therapien sehr eingeschränkt ist. Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi) wie Trichostatin A (TSA) gelten als vielversprechende Wirkstoffgruppe in der Behandlung von NP-C.
2. NP-C-Patienten-Fibroblasten sind ein vielfach genutztes Modell zur Erforschung der Erkrankung, welches sich durch seine Praktikabilität und gute Verfügbarkeit als Modell auszeichnet.
3. Es wurden verschiedene Ansätze beschrieben, um humane neuronale NP-C-Modelle zu erstellen. shRNA-basierte Ansätze sind praktikabel und können verschiedene zentrale Elemente der humanen Pathophysiologie abbilden.
4. Faltungsdefekte wurden in anderen lysosomalen Speichererkrankungen wie Morbus Gaucher als pathophysiologisch bedeutsam beschrieben. TSA kann als Induktor von Chaperonen Faltungsdefekten entgegenwirken. Weiterhin kann TSA über direkte Induktion des NPC1-Promotors auf die Expression von NPC1 wirken.
5. In NPC^{mt}-Fibroblasten konnte TSA in einer distinkten NPC1-Antikörper immunreaktiven Bande bei 200 bis 210kDa einen signifikanten Effekt auf NPC1 im Western Blot erbringen (Steigerung um das 3,2- (GM18436; $\pm 0,08$) beziehungsweise um das 3,6-fache (GM03123, $\pm 0,49$)). Dies kann einen Hinweis auf einen zugrundeliegenden Faltungsdefekt bei NP-C darstellen. Die TSA-Inkubation kann einem Faltungsdefekt des NPC1^{mt}-Proteins entgegengewirkt haben und eine noch im endoplasmatischen Retikulum befindliche Form des NPC1-Proteins hervorgebracht haben.
6. In humanen neuronalen Progenitorzellen (hNPZ) konnte durch Transfektion zweier unterschiedlicher shRNA-Konstrukte eine signifikante Verminderung der NPC1-Expression auf $45\pm 6\%$ bzw. $55\pm 8\%$ des NPC1-Ausgangsniveaus erreicht werden.
7. TSA konnte in hNPZ nach shRNA-vermittelter NPC1-Herunterregulation eine signifikante Steigerung der NPC1-Bande im Western Blot von $47\pm 3,3\%$ auf $73\pm 11\%$ bewirken.
8. Es konnte erstmalig ein Effekt auf NPC1 durch einen HDACi in einem humanen neuronalen NP-C Zellmodell beschrieben werden.

8 Endnoten, Literaturverzeichnis

- ¹ OMIM Entry: 607623, NCBI Gene ID: 4864, Ensembl: ENSG00000141458
- ² Uniprot: 15118
- ³ <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=NPC1>, abgerufen am 9.1.2015
- ⁴ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01747135>, abgerufen am 23.1.2015
- ⁵ Sämtliche Materialien und Ge werden ohne TM oder [®] -Zeichen aufgeführt; daraus ist nicht zu schließen, dass es sich nicht um geschützte Marken oder Produkte handelt.
- ⁶ Oligonukleotidsequenz JPG11: 5'-GGTCTCACTAGGCATCGCG-3',
Oligonukleotidsequenz JPG15: 5'-ACCAATTGTGATAGCAATATT-3'
- ⁷ <https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>

Abi-Mosleh, L., Infante, R.E., Radhakrishnan, A., Goldstein, J.L., und Brown, M.S. (2009). Cyclodextrin overcomes deficient lysosome-to-endoplasmic reticulum transport of cholesterol in Niemann-Pick type C cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 19316–19321.

Adnan, H., Zhang, Z., Park, H.-J., Tailor, C., Che, C., Kamani, M., Spitalny, G., Binnington, B., und Lingwood, C. (2016). Endoplasmic Reticulum-Targeted Subunit Toxins Provide a New Approach to Rescue Misfolded Mutant Proteins and Revert Cell Models of Genetic Diseases. *PloS One* *11*, e0166948.

Alam, M.S., Getz, M., und Haldar, K. (2016). Chronic administration of an HDAC inhibitor treats both neurological and systemic Niemann-Pick type C disease in a mouse model. *Sci. Transl. Med.* *8*, 326ra23-326ra23.

Appelqvist, H., Sandin, L., Björnström, K., Saftig, P., Garner, B., Öllinger, K., und Kågedal, K. (2012). Sensitivity to Lysosome-Dependent Cell Death Is Directly Regulated by Lysosomal Cholesterol Content. *PLoS ONE* *7*, e50262.

Aqul, A., Liu, B., Ramirez, C.M., Pieper, A.A., Estill, S.J., Burns, D.K., Liu, B., Repa, J.J., Turley, S.D., und Dietschy, J.M. (2011). Unesterified Cholesterol Accumulation in Late Endosomes/Lysosomes Causes Neurodegeneration and Is Prevented by Driving Cholesterol Export from This Compartment. *J. Neurosci.* *31*, 9404–9413.

- Arora, S., Beaudry, C., Bisanz, K.M., Sima, C., Kiefer, J.A., und Azorsa, D.O. (2010). A High-Content RNAi-Screening Assay to Identify Modulators of Cholesterol Accumulation in Niemann–Pick Type C Cells. *ASSAY Drug Dev. Technol.* 8, 295–319.
- Avchalumov, Y., Kirschstein, T., Lukas, J., Luo, J., Wree, A., Rolfs, A., und Köhling, R. (2012). Increased excitability and compromised long-term potentiation in the neocortex of NPC1(-/-) mice. *Brain Res.* 1444, 20–26.
- Baumeister, P., Dong, D., Fu, Y., und Lee, A.S. (2009). Transcriptional induction of GRP78/BiP by histone deacetylase inhibitors and resistance to histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1086–1094.
- Bergamin, N., Dardis, A., Beltrami, A., Cesselli, D., Rigo, S., Zampieri, S., Domenis, R., Bembi, B., und Beltrami, C.A. (2013). A human neuronal model of Niemann Pick C disease developed from stem cells isolated from patient's skin. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 34.
- Bhuvaneshwaran, C., Morris, M.D., Shio, H., und Fowler, S. (1982). Lysosome lipid storage disorder in NCTR-BALB/c mice. III. Isolation and analysis of storage inclusions from liver. *Am. J. Pathol.* 108, 160–170.
- Bouchecareilh, M., Hutt, D.M., Szajner, P., Flotte, T.R., und Balch, W.E. (2012). Histone Deacetylase Inhibitor (HDACi) Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA)-mediated Correction of α 1-Antitrypsin Deficiency. *J. Biol. Chem.* 287, 38265–38278.
- Brady, R.O., Kanfer, J.N., Mock, M.B., und Fredrickson, D.S. (1966). The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55, 366–369.
- Brady, R.O., Yang, C., und Zhuang, Z. (2013). An innovative approach to the treatment of Gaucher disease and possibly other metabolic disorders of the brain. *J. Inher. Metab. Dis.* 36, 451–454.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., und Agami, R. (2002). A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 296, 550–553.
- Butler, J.D., Blanchette-Mackie, J., Goldin, E., O'Neill, R.R., Carstea, G., Roff, C.F., Patterson, M.C., Patel, S., Comly, M.E., und Cooney, A. (1992). Progesterone blocks cholesterol translocation from lysosomes. *J. Biol. Chem.* 267, 23797–23805.

- Camargo, F., Erickson, R.P., Garver, W.S., Hossain, G.S., Carbone, P.N., Heidenreich, R.A., und Blanchard, J. (2001). Cyclodextrins in the treatment of a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Life Sci.* 70, 131–142.
- Campo, J.V., Stowe, R., Slomka, G., Byler, D., und Gracious, B. (1998). Psychosis as a presentation of physical disease in adolescence: a case of Niemann–Pick disease, type C. *Dev. Med. Child Neurol.* 40, 126–129.
- Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pavan, W.J., Krizman, D.B., *et al.* (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277, 228–231.
- Chhangani, D., und Mishra, A. (2013). Protein Quality Control System in Neurodegeneration: A Healing Company Hard to Beat but Failure is Fatal. *Mol. Neurobiol.* 48, 141–156.
- Cianciola, N.L., Carlin, C.R., und Kelley, T.J. (2011). Molecular pathways for intracellular cholesterol accumulation: Common pathogenic mechanisms in Niemann–Pick disease Type C and cystic fibrosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 515, 54–63.
- Coppedè, F. (2014). The potential of epigenetic therapies in neurodegenerative diseases. *Front. Genet.* 5, 220.
- Crocker, A.C., und Farber, S. (1958). Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients. *Medicine (Baltimore)* 37, 1–95.
- Crumling, M.A., Liu, L., Thomas, P.V., Benson, J., Kanicki, A., Kabara, L., Hälsey, K., Dolan, D., und Duncan, R.K. (2012). Hearing Loss and Hair Cell Death in Mice Given the Cholesterol-Chelating Agent Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. *PLoS ONE* 7, e53280.
- Daggett, V., und Egelman, E.H. (2012). The folding of proteins and nucleic acids (Amsterdam [u.a.]: Elsevier).
- Davies, J.P., und Ioannou, Y.A. (2000). Topological Analysis of Niemann-Pick C1 Protein Reveals That the Membrane Orientation of the Putative Sterol-sensing Domain Is Identical to Those of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase and Sterol Regulatory Element Binding Protein Cleavage-activating Protein. *J. Biol. Chem.* 275, 24367–24374.

- Deffieu, M.S., und Pfeffer, S.R. (2011). Niemann–Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 18932–18936.
- Donato, R., Miljan, E.A., Hines, S.J., Aouabdi, S., Pollock, K., Patel, S., Edwards, F.A., und Sinden, J.D. (2007). Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neurosci.* 8, 36.
- Efthymiou, A.G., Steiner, J., Pavan, W.J., Wincovitch, S., Larson, D.M., Porter, F.D., Rao, M.S., und Malik, N. (2015). Rescue of an in vitro neuron phenotype identified in Niemann-Pick disease, type C1 induced pluripotent stem cell-derived neurons by modulating the WNT pathway and calcium signaling. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 230–238.
- Fan, J.Q., Ishii, S., Asano, N., und Suzuki, Y. (1999). Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat. Med.* 5, 112–115.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., und Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Garver, W.S., Francis, G.A., Jelinek, D., Shepherd, G., Flynn, J., Castro, G., Walsh Vockley, C., Coppock, D.L., Pettit, K.M., Heidenreich, R.A., *et al.* (2007). The National Niemann–Pick C1 disease database: Report of clinical features and health problems. *Am. J. Med. Genet. A.* 143A, 1204–1211.
- Gaub, P., Joshi, Y., Wuttke, A., Naumann, U., Schnichels, S., Heiduschka, P., und Di Giovanni, S. (2011). The histone acetyltransferase p300 promotes intrinsic axonal regeneration. *Brain J. Neurol.* 134, 2134–2148.
- Gelsthorpe, M.E., Baumann, N., Millard, E., Gale, S.E., Langmade, S.J., Schaffer, J.E., und Ory, D.S. (2008). Niemann-Pick Type C1 I1061T Mutant Encodes a Functional Protein That Is Selected for Endoplasmic Reticulum-associated Degradation Due to Protein Misfolding. *J. Biol. Chem.* 283, 8229–8236.
- German, D.C., Liang, C.L., Song, T., Yazdani, U., Xie, C., und Dietschy, J.M. (2002). Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: glial involvement. *Neuroscience* 109, 437–450.

- Gévry, N.Y., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., und Murphy, B.D. (2003). Regulation of Niemann-Pick C1 Gene Expression by the 3'5'-Cyclic Adenosine Monophosphate Pathway in Steroidogenic Cells. *Mol. Endocrinol.* 17, 704–715.
- Giese, A.-K., Mascher, H., Grittner, U., Eichler, S., Kramp, G., Lukas, J., Vrucite, D., Eisa, N.A., Cortina-Borja, M., Porter, F.D., *et al.* (2015). A novel, highly sensitive und specific biomarker for Niemann-Pick type C1 disease. *Orphanet J. Rare Dis.* 10, 78.
- Gräff, J., Kim, D., Dobbin, M.M., und Tsai, L.-H. (2011). Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol. Rev.* 91, 603–649.
- Greer, W.L., Riddell, D.C., Gillan, T.L., Girouard, G.S., Sparrow, S.M., Byers, D.M., Dobson, M.J., und Neumann, P.E. (1998). The Nova Scotia (type D) form of Niemann-Pick disease is caused by a G3097-->T transversion in NPC1. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 52–54.
- Helquist, P., Maxfield, F.R., Wiech, N.L., und Wiest, O. (2013). Treatment of Niemann-pick type C disease by histone deacetylase inhibitors. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 10, 688–697.
- Hendriksz, C.J., Anheim, M., Bauer, P., Bonnot, O., Chakrapani, A., Corvol, J.-C., de Koning, T.J., Degtyareva, A., Dionisi-Vici, C., Doss, S., *et al.* (2017). The hidden Niemann-Pick type C patient: clinical niches for a rare inherited metabolic disease. *Curr. Med. Res. Opin.* 33, 877–890.
- Hockly, E., Richon, V.M., Woodman, B., Smith, D.L., Zhou, X., Rosa, E., Sathasivam, K., Ghazi-Noori, S., Mahal, A., Lowden, P.A.S., *et al.* (2003). Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2041–2046.
- Hoffrogge, R., Mikkat, S., Scharf, C., Beyer, S., Christoph, H., Pahnke, J., Mix, E., Berth, M., Uhrmacher, A., Zubrzycki, I.Z., *et al.* (2006). 2-DE proteome analysis of a proliferating and differentiating human neuronal stem cell line (ReNcell VM). *PROTEOMICS* 6, 1833–1847.
- Hovakimyan, M., Stachs, O., Reichard, M., Mascher, H., Lukas, J., Frech, M.J., Guthoff, R., Witt, M., Rolfs, A., und Wree, A. (2011). Morphological alterations of the cornea in the mouse model of niemann-pick disease type c1. *Cornea* 30, 796–803.

- Hovakimyan, M., Meyer, A., Lukas, J., Luo, J., Gudziol, V., Hummel, T., Rolfs, A., Wree, A., und Witt, M. (2013a). Olfactory deficits in Niemann-Pick type C1 (NPC1) disease. *PloS One* 8, e82216.
- Hovakimyan, M., Maass, F., Petersen, J., Holzmann, C., Witt, M., Lukas, J., Frech, M.J., Hübner, R., Rolfs, A., und Wree, A. (2013b). Combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat improves motor but not cognitive functions in Niemann–Pick Type C1 mice. *Neuroscience* 252, 201–211.
- Huang, X., Suyama, K., Buchanan, J., Zhu, A.J., und Scott, M.P. (2005). A *Drosophila* model of the Niemann-Pick type C lysosome storage disease: *dnpc1a* is required for molting and sterol homeostasis. *Dev. Camb. Engl.* 132, 5115–5124.
- Hübner, R., Schmöle, A.-C., Liedmann, A., Frech, M.J., Rolfs, A., und Luo, J. (2010). Differentiation of human neural progenitor cells regulated by Wnt-3a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 358–362.
- Hutt, D.M., Herman, D., Rodrigues, A.P.C., Noel, S., Pilewski, J.M., Matteson, J., Hoch, B., Kellner, W., Kelly, J.W., Schmidt, A., *et al.* (2010). Reduced histone deacetylase 7 activity restores function to misfolded CFTR in cystic fibrosis. *Nat. Chem. Biol.* 6, 25–33.
- Jaeger, A., Fröhlich, M., Klum, S., Lantow, M., Viergutz, T., Weiss, D.G., und Kriehuber, R. (2015). Characterization of Apoptosis Signaling Cascades During the Differentiation Process of Human Neural ReNcell VM Progenitor Cells In Vitro. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 1203–1216.
- Karten, B., Peake, K.B., und Vance, J.E. (2009). Mechanisms and consequences of impaired lipid trafficking in Niemann–Pick type C1-deficient mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1791, 659–670.
- Kazantsev, A.G., und Thompson, L.M. (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 854–868.
- Khanna, R., Benjamin, E.R., Pellegrino, L., Schilling, A., Rigat, B.A., Soska, R., Nafar, H., Ranes, B.E., Feng, J., Lun, Y., *et al.* (2010). The pharmacological chaperone isofagomine increases the activity of the Gaucher disease L444P mutant form of beta-glucosidase. *FEBS J.* 277, 1618–1638.

- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., *et al.* (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* **467**, 285–290.
- Kim, S.-J., Lee, B.-H., Lee, Y.-S., und Kang, K.-S. (2007). Defective cholesterol traffic and neuronal differentiation in neural stem cells of Niemann–Pick type C disease improved by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 593–599.
- Koh, C.H.V., und Cheung, N.S. (2006). Cellular mechanism of U18666A-mediated apoptosis in cultured murine cortical neurons: Bridging Niemann–Pick disease type C and Alzheimer’s disease. *Cell. Signal.* **18**, 1844–1853.
- Kruth, H.S., Comly, M.E., Butler, J.D., Vanier, M.T., Fink, J.K., Wenger, D.A., Patel, S., und Pentchev, P.G. (1986). Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **261**, 16769–16774.
- Kuwamura, M., Awakura, T., Shimada, A., Umemura, T., Kagota, K., Kawamura, N., und Naiki, M. (1993). Type C Niemann-Pick disease in a boxer dog. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **85**, 345–348.
- Kwon, H.J., Abi-Mosleh, L., Wang, M.L., Deisenhofer, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., und Infante, R.E. (2009). Structure of N-Terminal Domain of NPC1 Reveals Distinct Subdomains for Binding and Transfer of Cholesterol. *Cell* **137**, 1213–1224.
- Lange, C., Mix, E., Frahm, J., Glass, Ä., Müller, J., Schmitt, O., Schmöle, A.-C., Klemm, K., Ortinau, S., Hübner, R., *et al.* (2011). Small molecule GSK-3 inhibitors increase neurogenesis of human neural progenitor cells. *Neurosci. Lett.* **488**, 36–40.
- Lange, Y., Ye, J., Rigney, M., und Steck, T. (2000). Cholesterol movement in Niemann-Pick type C cells and in cells treated with amphiphiles. *J. Biol. Chem.* **275**, 17468–17475.
- Leoni, F., Zaliani, A., Bertolini, G., Porro, G., Pagani, P., Pozzi, P., Donà, G., Fossati, G., Sozzani, S., Azam, T., *et al.* (2002). The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2995–3000.

- Liscum, L., und Faust, J.R. (1989). The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *J. Biol. Chem.* 264, 11796–11806.
- Liu, B., Turley, S.D., Burns, D.K., Miller, A.M., Repa, J.J., und Dietschy, J.M. (2009). Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the npc1^{-/-} mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 2377–2382.
- Löffler, G. (2008). *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie ; mit 139 Tabellen ;* (Heidelberg: Springer).
- Love, S., Bridges, L.R., und Case, C.P. (1995). Neurofibrillary tangles in Niemann—Pick disease type C. *Brain* 118, 119–129.
- Lowenthal, A.C., Cummings, J.F., Wenger, D.A., Thrall, M.A., Wood, P.A., und de Lahunta, A. (1990). Feline sphingolipidosis resembling Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 81, 189–197.
- Lu, J., Yang, C., Chen, M., Ye, D.Y., Lonser, R.R., Brady, R.O., und Zhuang, Z. (2011a). Histone deacetylase inhibitors prevent the degradation and restore the activity of glucocerebrosidase in Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 21200–21205.
- Lu, J., Yang, C., Chen, M., Ye, D.Y., Lonser, R.R., Brady, R.O., und Zhuang, Z. (2011b). Histone deacetylase inhibitors prevent the degradation and restore the activity of glucocerebrosidase in Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 21200–21205.
- Lukas, J., Pockrandt, A.-M., Seemann, S., Sharif, M., Runge, F., Pohlers, S., Zheng, C., Gläser, A., Beller, M., Rolfs, A., *et al.* (2014). Enzyme Enhancers for the treatment of Fabry and Pompe Disease. *Mol. Ther.*
- Lyon, M.F., Hulse, E.V., und Rowe, C.E. (1965). Foam-cell Reticulosis of Mice: An Inherited Condition Resembling Gaucher's and Niemann-Pick Diseases. *J. Med. Genet.* 2, 99–106.
- Maass, F., Petersen, J., Hovakimyan, M., Schmitt, O., Witt, M., Hawlitschka, A., Lukas, J., Rolfs, A., und Wree, A. (2014). Reduced cerebellar neurodegeneration after combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat in NPC1: A mouse model of Niemann-Pick type C1 disease. *J. Neurosci. Res.* n/a-n/a.

- Macías-Vidal, J., Girós, M., Guerrero, M., Gascón, P., Serratosa, J., Bachs, O., und Coll, M.J. (2014). The proteasome inhibitor bortezomib reduced cholesterol accumulation in fibroblasts from Niemann–Pick type C patients carrying missense mutations. *FEBS J.* **281**, 4450–4466.
- Maegawa, G.H.B., Tropak, M.B., Buttner, J.D., Rigat, B.A., Fuller, M., Pandit, D., Tang, L., Kornhaber, G.J., Hamuro, Y., Clarke, J.T.R., *et al.* (2009). Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease. *J. Biol. Chem.* **284**, 23502–23516.
- Maetzel, D., Sarkar, S., Wang, H., Abi-Mosleh, L., Xu, P., Cheng, A.W., Gao, Q., Mitalipova, M., und Jaenisch, R. (2014). Genetic and Chemical Correction of Cholesterol Accumulation and Impaired Autophagy in Hepatic and Neural Cells Derived from Niemann-Pick Type C Patient-Specific iPS Cells. *Stem Cell Rep.* **2**, 866–880.
- Malathi, K., Higaki, K., Tinkelenberg, A.H., Balderes, D.A., Almanzar-Paramio, D., Wilcox, L.J., Erdeniz, N., Redican, F., Padamsee, M., Liu, Y., *et al.* (2004). Mutagenesis of the putative sterol-sensing domain of yeast Niemann Pick C-related protein reveals a primordial role in subcellular sphingolipid distribution. *J. Cell Biol.* **164**, 547–556.
- Maue, R.A., Burgess, R.W., Wang, B., Wooley, C.M., Seburn, K.L., Vanier, M.T., Rogers, M.A., Chang, C.C., Chang, T.Y., und Harris, B.T. (2012). A novel mouse model of Niemann–Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 730–750.
- Mazemondet, O., Hubner, R., Frahm, J., Koczan, D., Bader, B., Weiss, D., Uhrmacher, A., Frech, M., Rolfs, A., und Luo, J. (2011). Quantitative and kinetic profile of Wnt/ β -catenin signaling components during human neural progenitor cell differentiation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **16**, 515–538.
- Meyer, A., Wree, A., Günther, R., Holzmann, C., Schmitt, O., Rolfs, A., und Witt, M. (2017). Increased Regenerative Capacity of the Olfactory Epithelium in Niemann-Pick Disease Type C1. *Int. J. Mol. Sci.* **18**.
- Millat, G., Marçais, C., Rafi, M.A., Yamamoto, T., Morris, J.A., Pentchev, P.G., Ohno, K., Wenger, D.A., und Vanier, M.T. (1999). Niemann-Pick C1 disease: the I1061T

substitution is a frequent mutant allele in patients of Western European descent and correlates with a classic juvenile phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 1321–1329.

Millat, G., Marçais, C., Tomasetto, C., Chikh, K., Fensom, A.H., Harzer, K., Wenger, D.A., Ohno, K., und Vanier, M.T. (2001). Niemann-Pick C1 Disease: Correlations between NPC1 Mutations, Levels of NPC1 Protein, and Phenotypes Emphasize the Functional Significance of the Putative Sterol-Sensing Domain and of the Cysteine-Rich Luminal Loop. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1373–1385.

Miyawaki, S., Mitsuoka, S., Sakiyama, T., und Kitagawa, T. (1982). Sphingomyelinosis, a new mutation in the mouse A model of Niemann-Pick disease in humans. *J. Hered.* 73, 257–263.

Morris, M.D., Bhuvaneswaran, C., Shio, H., und Fowler, S. (1982). Lysosome lipid storage disorder in NCTR-BALB/c mice. I. Description of the disease and genetics. *Am. J. Pathol.* 108, 140–149.

Munkacsi, A.B., Chen, F.W., Brinkman, M.A., Higaki, K., Gutiérrez, G.D., Chaudhari, J., Layer, J.V., Tong, A., Bard, M., Boone, C., *et al.* (2011). An “Exacerbate-reverse” Strategy in Yeast Identifies Histone Deacetylase Inhibition as a Correction for Cholesterol and Sphingolipid Transport Defects in Human Niemann-Pick Type C Disease. *J. Biol. Chem.* 286, 23842–23851.

Mußmann, C., Hübner, R., Trilck, M., Rolfs, A., und Frech, M.J. (2014). HES5 is a key mediator of Wnt-3a-induced neuronal differentiation. *Stem Cells Dev.* 23, 1328–1339.

Nakasone, N., Nakamura, Y.S., Higaki, K., Oumi, N., Ohno, K., und Ninomiya, H. (2014). Endoplasmic Reticulum-associated Degradation of Niemann-Pick C1, evidence for the role of heat shock proteins and identification of lysine residues that accept ubiquitin. *J. Biol. Chem.* 289, 19714–19725.

Naureckiene, S., Sleat, D.E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M.T., Wattiaux, R., Jadot, M., und Lobel, P. (2000). Identification of HE1 as the Second Gene of Niemann-Pick C Disease. *Science* 290, 2298–2301.

Neufeld, E.B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A.M., Dwyer, N.K., Roff, C.F., Ohno, K., Morris, J.A., Carstea, E.D., *et al.* (1999). The Niemann-Pick C1 Protein Resides in a Vesicular Compartment Linked to Retrograde Transport of Multiple Lysosomal Cargo. *J. Biol. Chem.* 274, 9627–9635.

- NP-C Guidelines Working Group, Wraith, J.E., Baumgartner, M.R., Bembi, B., Covanis, A., Levade, T., Mengel, E., Pineda, M., Sedel, F., Topçu, M., *et al.* (2009). Recommendations on the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C. *Mol. Genet. Metab.* **98**, 152–165.
- Nunes, M.J., Moutinho, M., Gama, M.J., Rodrigues, C.M.P., und Rodrigues, E. (2013). Histone deacetylase inhibition decreases cholesterol levels in neuronal cells by modulating key genes in cholesterol synthesis, uptake and efflux. *PLoS One* **8**, e53394.
- Ordóñez, M.P., Roberts, E.A., Kidwell, C.U., Yuan, S.H., Plaisted, W.C., und Goldstein, L.S.B. (2012). Disruption and therapeutic rescue of autophagy in a human neuronal model of Niemann Pick type C1. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2651–2662.
- Papeleu, P., Vanhaecke, T., Elaut, G., Vinken, M., Henkens, T., Snykers, S., und Rogiers, V. (2005). Differential effects of histone deacetylase inhibitors in tumor and normal cells-what is the toxicological relevance? *Crit. Rev. Toxicol.* **35**, 363–378.
- Parenti, G., Zuppaldi, A., Gabriela Pittis, M., Rosaria Tuzzi, M., Annunziata, I., Meroni, G., Porto, C., Donaudy, F., Rossi, B., Rossi, M., *et al.* (2007). Pharmacological enhancement of mutated alpha-glucosidase activity in fibroblasts from patients with Pompe disease. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **15**, 508–514.
- Park, W.D., O'Brien, J.F., Lundquist, P.A., Kraft, D.L., Vockley, C.W., Karnes, P.S., Patterson, M.C., und Snow, K. (2003). Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: Correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Hum. Mutat.* **22**, 313–325.
- Patterson, M.C., Hendriksz, C.J., Walterfang, M., Sedel, F., Vanier, M.T., und Wijburg, F. (2012). Recommendations for the diagnosis and management of Niemann–Pick disease type C: An update. *Mol. Genet. Metab.* **106**, 330–344.
- Pentchev, P.G., Gal, A.E., Booth, A.D., Omodeo-Sale, F., Fouks, J., Neumeyer, B.A., Quirk, J.M., Dawson, G., und Brady, R.O. (1980). A lysosomal storage disorder in mice characterized by a dual deficiency of sphingomyelinase and glucocerebrosidase. *Biochim. Biophys. Acta* **619**, 669–679.
- Pentchev, P.G., Boothe, A.D., Kruth, H.S., Weintraub, H., Stivers, J., und Brady, R.O. (1984). A genetic storage disorder in BALB/C mice with a metabolic block in esterification of exogenous cholesterol. *J. Biol. Chem.* **259**, 5784–5791.

- Pipalia, N.H., Cosner, C.C., Huang, A., Chatterjee, A., Bourbon, P., Farley, N., Helquist, P., Wiest, O., und Maxfield, F.R. (2011). Histone Deacetylase Inhibitor Treatment Dramatically Reduces Cholesterol Accumulation in Niemann-Pick Type C1 Mutant Human Fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 5620–5625.
- Pipalia, N.H., Subramanian, K., Mao, S., Ralph, H., Hutt, D.M., Scott, S.M., Balch, W.E., und Maxfield, F.R. (2017). Histone deacetylase inhibitors correct the cholesterol storage defect in most Niemann-Pick C1 mutant cells. *J. Lipid Res.* *58*, 695–708.
- Praggastis, M., Tortelli, B., Zhang, J., Fujiwara, H., Sidhu, R., Chacko, A., Chen, Z., Chung, C., Lieberman, A.P., Sikora, J., *et al.* (2015). A Murine Niemann-Pick C1 I1061T Knock-In Model Recapitulates the Pathological Features of the Most Prevalent Human Disease Allele. *J. Neurosci.* *35*, 8091–8106.
- Qiang, L., Fujita, R., und Abeliovich, A. (2013). Remodeling Neurodegeneration: Somatic Cell Reprogramming-Based Models of Adult Neurological Disorders. *Neuron* *78*, 957–969.
- Rodriguez-Gil, J.L., Larson, D.M., Wassif, C.A., Yanjanin, N.M., Anderson, S.M., Kirby, M.R., Trivedi, N.S., Porter, F.D., und Pavan, W.J. (2013). A somatic cell defect is associated with the onset of neurological symptoms in a lysosomal storage disease. *Mol. Genet. Metab.* *110*, 188–190.
- Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Bonnet, J., Pentchev, P.G., Louisot, P., und Vanier, M.T. (1990). Abnormal cholesterol metabolism in imipramine-treated fibroblast cultures. Similarities with Niemann-Pick type C disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* *1043*, 123–128.
- Rodríguez-Pascau, L., Coll, M.J., Casas, J., Vilageliu, L., und Grinberg, D. (2012). Generation of a human neuronal stable cell model for niemann-pick C disease by RNA interference. *JIMD Rep.* *4*, 29–37.
- Rosenbaum, A.I., und Maxfield, F.R. (2011). Niemann-Pick type C disease: molecular mechanisms and potential therapeutic approaches. *J. Neurochem.* *116*, 789–795.
- Runz, H., Dolle, D., Schlitter, A.M., und Zschocke, J. (2008). NPC-db, a Niemann-Pick type C disease gene variation database. *Hum. Mutat.* *29*, 345–350.
- Ryu, H., Lee, J., Olofsson, B.A., Mwidau, A., Dedeoglu, A., Escudero, M., Flemington, E., Azizkhan-Clifford, J., Ferrante, R.J., Ratan, R.R., *et al.* (2003). Histone deacetylase inhibitors prevent oxidative neuronal death independent of expanded polyglutamine

repeats via an Sp1-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4281–4286.

Saha, R., und Pahan, K. (2006). HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ.* **13**, 539–550.

Schmöle, A.-C., Brennfürer, A., Karapetyan, G., Jaster, R., Pews-Davtyan, A., Hübner, R., Ortinau, S., Beller, M., Rolfs, A., und Frech, M.J. (2010). Novel indolylmaleimide acts as GSK-3 β inhibitor in human neural progenitor cells. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 6785–6795.

Shio, H., Fowler, S., Bhuvaneswaran, C., und Morris, M.D. (1982). Lysosome lipid storage disorder in NCTR-BALB/c mice. II. Morphologic and cytochemical studies. *Am. J. Pathol.* **108**, 150–159.

Siebzehnruhl, F.A., Buslei, R., Eyupoglu, I.Y., Seufert, S., Hahnen, E., und Blumcke, I. (2007). Histone deacetylase inhibitors increase neuronal differentiation in adult forebrain precursor cells. *Exp. Brain Res.* **176**, 672–678.

Sleat, D.E., Wiseman, J.A., El-Banna, M., Price, S.M., Verot, L., Shen, M.M., Tint, G.S., Vanier, M.T., Walkley, S.U., und Lobel, P. (2004). Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 5886–5891.

Sokol, J., Blanchette-Mackie, J., Kruth, H.S., Dwyer, N.K., Amende, L.M., Butler, J.D., Robinson, E., Patel, S., Brady, R.O., und Comly, M.E. (1988). Type C Niemann-Pick disease. Lysosomal accumulation and defective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol. *J. Biol. Chem.* **263**, 3411–3417.

Spear, E.D., und Ng, D.T.W. (2003). Stress Tolerance of Misfolded Carboxypeptidase Y Requires Maintenance of Protein Trafficking and Degradative Pathways. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2756–2767.

Spiegel, R., Raas-Rothschild, A., Reish, O., Regev, M., Meiner, V., Bargal, R., Sury, V., Meir, K., Nadjari, M., Hermann, G., *et al.* (2009). The clinical spectrum of fetal Niemann–Pick type C. *Am. J. Med. Genet. A.* **149A**, 446–450.

Steffan, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.Z., Greenwald, M., *et al.* (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* **413**, 739–743.

- Su, S.C., und Tsai, L.-H. (2011). Cyclin-dependent kinases in brain development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 465–491.
- Sym, M., Basson, M., und Johnson, C. (2000). A model for niemann-pick type C disease in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol. CB* 10, 527–530.
- Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., und Arai, N. (1988). SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 8, 466–472.
- Trilck, M., Hübner, R., Seibler, P., Klein, C., Rolfs, A., und Frech, M.J. (2013). Niemann-Pick type C1 patient-specific induced pluripotent stem cells display disease specific hallmarks. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 144.
- Trilck, M., Hübner, R., und Frech, M.J. (2016). Generation and Neuronal Differentiation of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Niemann-Pick Type C1 Fibroblasts. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1353, 233–259.
- Trilck, M., Peter, F., Zheng, C., Frank, M., Dobrenis, K., Mascher, H., Rolfs, A., und Frech, M.J. (2017). Diversity of glycosphingolipid GM2 and cholesterol accumulation in NPC1 patient-specific iPSC-derived neurons. *Brain Res.* 1657, 52–61.
- Vance, J.E., Hayashi, H., und Karten, B. (2005). Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 193–212.
- Vance, J.E., Karten, B., und Hayashi, H. (2006). Lipid dynamics in neurons. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 399.
- Vanier, M.T. (1999). Lipid changes in Niemann-Pick disease type C brain: personal experience and review of the literature. *Neurochem. Res.* 24, 481–489.
- Vanier, M.T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J. Rare Dis.* 5, 16.
- Vanier, M.T. (2014). Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1–13.
- Vanier, M.T., und Latour, P. (2015). Chapter 18 - Laboratory diagnosis of Niemann–Pick disease type C: The filipin staining test. In *Methods in Cell Biology*, F.P. and N. Platt, ed. (Academic Press), pp. 357–375.
- Vanier, M.T., und Millat, G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clin. Genet.* 64, 269–281.

- Walkley, S.U., und Suzuki, K. (2004). Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1685, 48–62.
- Walkley, S.U., Siegel, D.A., Dobrenis, K., und Zervas, M. (1998). GM2 ganglioside as a regulator of pyramidal neuron dendritogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845, 188–199.
- Walterfang, M., Chien, Y.-H., Imrie, J., Rushton, D., Schubiger, D., und Patterson, M.C. (2012). Dysphagia as a risk factor for mortality in Niemann-Pick disease type C: systematic literature review and evidence from studies with miglustat. *Orphanet J. Rare Dis.* 7, 76.
- Wang, M.L., Motamed, M., Infante, R.E., Abi-Mosleh, L., Kwon, H.J., Brown, M.S., und Goldstein, J.L. (2010). Identification of Surface Residues on Niemann-Pick C2 (NPC2) Essential for Hydrophobic Handoff of Cholesterol to NPC1 in Lysosomes. *Cell Metab.* 12, 166–173.
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Watari, M., Neufeld, E.B., Patel, S., Pentchev, P.G., und Strauss, J.F. (1999a). Mutations in the leucine zipper motif and sterol-sensing domain inactivate the Niemann-Pick C1 glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 274, 21861–21866.
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Glick, J.M., Patel, S., Neufeld, E.B., Brady, R.O., Pentchev, P.G., und Strauss, J.F. (1999b). Niemann-Pick C1 protein: Obligatory roles for N-terminal domains and lysosomal targeting in cholesterol mobilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 805–810.
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Watari, M., Burd, C.G., Patel, S., Pentchev, P.G., und Strauss III, J.F. (2000). Determinants of NPC1 Expression and Action: Key Promoter Regions, Posttranscriptional Control, and the Importance of a “Cysteine-Rich” Loop. *Exp. Cell Res.* 259, 247–256.
- Wehrmann, Z.T., Hulett, T.W., Huegel, K.L., Vaughan, K.T., Wiest, O., Helquist, P., und Goodson, H. (2012). Quantitative Comparison of the Efficacy of Various Compounds in Lowering Intracellular Cholesterol Levels in Niemann-Pick Type C Fibroblasts. *PLoS ONE* 7, e48561.
- Wraith, J.E., Baumgartner, M.R., Bembi, B., Covanis, A., Levade, T., Mengel, E., Pineda, M., Sedel, F., Topçu, M., Vanier, M.T., *et al.* (2009). Recommendations on the

diagnosis und management of Niemann-Pick disease type C. *Mol. Genet. Metab.* **98**, 152–165.

Yan, X., Lukas, J., Witt, M., Wree, A., Hübner, R., Frech, M., Köhling, R., Rolfs, A., und Luo, J. (2011). Decreased expression of myelin gene regulatory factor in Niemann-Pick type C 1 mouse. *Metab. Brain Dis.* **26**, 299–306.

Yan, X., Ma, L., Hovakimyan, M., Lukas, J., Wree, A., Frank, M., Guthoff, R., Rolfs, A., Witt, M., und Luo, J. (2014a). Defects in the retina of Niemann-pick type C 1 mutant mice. *BMC Neurosci.* **15**, 126.

Yan, X., Lukas, J., Lin, J., Ernst, M., Koczan, D., Witt, M., Fuellen, G., Wree, A., Rolfs, A., und Luo, J. (2014b). Aberrant expressions of delta-protocadherins in the brain of Npc1 mutant mice. *Histol. Histopathol.* **29**, 1185–1199.

Yang, X.-J., und Seto, E. (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* **26**, 5310–5318.

Yang, C., Rahimpour, S., Lu, J., Pacak, K., Ikejiri, B., Brady, R.O., und Zhuang, Z. (2013). Histone deacetylase inhibitors increase glucocerebrosidase activity in Gaucher disease by modulation of molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 966–971.

Yang, C., Swallows, C.L., Zhang, C., Lu, J., Xiao, H., Brady, R.O., und Zhuang, Z. (2014). Celastrol increases glucocerebrosidase activity in Gaucher disease by modulating molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 249–254.

Yang, C., Wang, H., Zhu, D., Hong, C.S., Dmitriev, P., Zhang, C., Li, Y., Ikejiri, B., Brady, R.O., und Zhuang, Z. (2015). Mutant glucocerebrosidase in Gaucher disease recruits Hsp27 to the Hsp90 chaperone complex for proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 1137–1142.

Yang, S.R., Kim, S.J., Byun, K.H., Hutchinson, B., Lee, B.H., Michikawa, M., Lee, Y.S., und Kang, K.S. (2006). NPC1 Gene Deficiency Leads to Lack of Neural Stem Cell Self-Renewal and Abnormal Differentiation Through Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Stem Cells* **24**, 292–298.

Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., und Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* **265**, 17174–17179.

You, B.R., und Park, W.H. (2013). Trichostatin A induces apoptotic cell death of HeLa cells in a Bcl-2 and oxidative stress-dependent manner. *Int. J. Oncol.* 42, 359–366.

Yu, D., Swaroop, M., Wang, M., Baxa, U., Yang, R., Yan, Y., Coksaygan, T., DeTolla, L., Marugan, J.J., Austin, C.P., *et al.* (2014). Niemann–Pick Disease Type C: Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Neuronal Cells for Modeling Neural Disease and Evaluating Drug Efficacy. *J. Biomol. Screen.* 19, 1164–1173.

Yu, T., Chung, C., Shen, D., Xu, H., und Lieberman, A.P. (2012). Ryanodine receptor antagonists adapt NPC1 proteostasis to ameliorate lipid storage in Niemann–Pick type C disease fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3205–3214.

Zampieri, S., Bembi, B., Rosso, N., Filocamo, M., und Dardis, A. (2011). Treatment of Human Fibroblasts Carrying NPC1 Missense Mutations with MG132 Leads to an Improvement of Intracellular Cholesterol Trafficking. *JIMD Rep.* 2, 59–69.

9 Anhang

Danksagungen

Nun ist's soweit – die Doktorarbeit ist geschrieben und ich möchte mich bei vielen für ihre Unterstützung bedanken:

An erster Stelle bei Prof. Rolfs – für die Möglichkeit, das Thema zu bearbeiten, die engagierte Begleitung und Ermutigung. Am Ende darf ich bei Abgabe der Arbeit hoffen, bei der Dissertation ein besseres Ergebnis zu erzielen als in der Partie Schach beim Vorstellungsgespräch (da hatte ich nämlich keine Chance).

Ein richtig großer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Jan Lukas – für die Begleitung und die detaillierte Diskussion der Arbeit. Dank gilt auch Dr. Jiankai Luo für Hilfe in den ersten Schritten der Projektfindung. Ganz viel Dank gilt den Mitarbeitern des Labors, die sich so viel Zeit genommen haben, mich auf meinen ersten Schritten im Labor zu unterstützen: Xin, Caroline, Christian und Venkat. Auch allen anderen Mitarbeitern des AKos möchte ich danken: Moritz, Michi, Rayk, Norman, Ellen und Sebastian.

Ein besonderer Dank gilt Dr. D. Schmidt, der als Supervisor den Beginn meiner klinischen Tätigkeit als Arzt in Berlin begleitet hat.

An meine Freunde, meine Schwester, meinen Bruder und meine Eltern herzlichen Dank für die Unterstützung – vor allem dafür, dass ihr trotz aller Unwegsamkeiten nicht den Glauben daran verloren habt, dass das Projekt zuletzt zu einem Ende findet.

Persönliche Informationen

Geburtsort: München
Geburtsdatum: 27.09.1985

Hochschulausbildung

10/2006 – 04/2014	Studium der Humanmedizin
10/2006 – 09/2009	Karls-Universität Prag, Tschechische Republik
10/2009 – 04/2014	Universität Rostock
02/2013 – 01/2014	praktisches Jahr des Medizinstudiums
02/2013 – 06/2013	Chirurgie, Kantonsspital Graubünden, Schweiz
06/2013 – 10/2013	Kinder- und Jugendpsychiatrie, Universitätsklinik Rostock
10/2013 – 02/2014	Innere Medizin, Südstadtklinikum Rostock
04/2014	zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Approbation als Arzt
seit 02/2015	Arzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie im Kindes- und Jugendalter der Charité Universitätsmedizin Berlin; Tätigkeiten in Patientenversorgung, Lehre und Forschung